

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BİYOKATALİTİK OLARAK ENANTIYOMERİK SAFLIKTA
 β -BLOKER ÜRETİMİ**

Rahime SONGÜR

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2019**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Rahime SONGÖR tarafından hazırlanan “**Biyokatalitik Olarak Enantiyomerik Sıfıkta β -Blokör Üretimi**” adlı tez çalışması 02/04/2019 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından oy birliğı ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı

Ü. Mehmetoğlu

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Tülin KUTSAL
Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliğı
Anabilim Dalı

T. Kutsal

Üye : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı

Ü. Mehmetoğlu

Üye : Prof. Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı

Z. Serpil

Üye : Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı

E. Bayraktar

Üye : Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL
Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliğı
Anabilim Dalı

Y. Sağ Açıkel

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdür Vekili

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

02.04.2019



Rahime SONGÜR

ÖZET

Doktora Tezi

BİYOKATALİTİK OLARAK ENANTİYOMERİK SAFLIKTA β-BLOKER ÜRETİMİ

Rahime SONGÜR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Farmasötik açıdan önem taşıyan β-blokerlar, kiral maddelerdir ve enantiyomerleri çoğunlukla farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahiptir. Bu çalışma kapsamında; yaygın olarak kullanılan β-blokerlardan biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, haloketonların mikrobiyal indirgenmesiyle propranololün çıkış maddesi olan halohidrinlerin üretimi ve rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu olmak üzere iki yöntem incelenmiştir. Bu yöntemlerden, ağırlıklı olarak rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Derasemizasyonda enzim kaynağı olarak kullanılacak uygun mikroorganizmayı belirlemek için farklı türdeki mikroorganizmalar (*Lactobacillus kefir* NRRL B-1839, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* CBS 111718, *Rhodotorula glutinis* DSM 70398, *Lactobacillus brevis*, *Rhizopus arrhizus* NCIM 997, *Geotrichum candidum* NCIM 980) tepkime ortamında kullanılmış ve en yüksek enantiyomerik aşırılık (% ee) değeri *Rhizopus oryzae* CBS 111718 ile elde edilmiştir. Bu mikroorganizmayla kesikli biyoreaktörde biyotransformasyon için farklı hücre üreme koşulları (katı ve sıvı üreme ortamı, sıvı üreme ortamının pH'ı, üreme sıcaklığı, hücre stoklama yöntemi, farklı spor çözeltileri vb.) ve farklı tepkime koşullarında (mikroorganizmayı parçalama yöntemi, tepkime ortamının türü, tepkime ortamının pH'ı, substrat derişimi, hücre derişimi, karıştırma hızı, sıcaklık, süre vb.) çalışılarak birçok parametrenin tepkimeye etkisi incelenmiştir. Daha sonra, Plackett Burman Yöntemi ile tepkime ortamını etkileyen altı parametreden (substrat derişimi, hücre derişimi, pH, sıcaklık, karıştırma hızı, süre) en önemli üç parametre (pH, süre, mikroorganizma derişimi) ve diğer parametrelerin seviyeleri ($C_0=1$ mM, $T=35^\circ\text{C}$, $KH=150$ rpm) belirlenmiştir. Bu üç parametre ile Cevap Yüzey Yöntemi uygulanarak % ee değerinin maksimize edildiği koşullarda; pH 6.86 tampon ortamı, 101 g/L hücre derişimi, 5.36 gün tepkime süresinde % ee değeri 54.7 olarak elde edilmiştir. Ayrıca, rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyon mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar da yapılmıştır.

Nisan 2019, 206 sayfa

Anahtar Kelimeler: β-bloker, propranolol, biyokatalitik derasemizasyon, enantiyoseçimlilik, *Rhizopus oryzae*

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

BIOCATALYTICAL PRODUCTION OF ENANTIOMERICALLY PURE β -BLOCKER

Rahime SONGÜR

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Pharmaceutically important β -blockers are chiral and the enantiomers of β -blockers usually have different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. In this study, the production of enantiomerically pure propranolol, which has commonly used as β -blockers, was aimed. In accordance with this purpose, two methods were investigated. These methods were the production of halohydrin which is the key intermediate of propranolol by microbial reduction of haloketone and biocatalytic deracemization of racemic propranolol. Biocatalytic deracemization of racemic propranolol was especially investigated among these methods.

Different strains of microorganisms as enzyme sources (*Lactobacillus kefir* NRRL B-1839, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* CBS 111718, *Rhodotorula glutinis* DSM 70398, *Lactobacillus brevis*, *Rhizopus arrhizus* NCIM 997, *Geotrichum candidum* NCIM 980) were used to determine the suitable microorganism for the deracemization. The highest enantiomeric excess (ee %) value was obtained with *Rhizopus oryzae* CBS 111718. The biotransformation reactions were carried out at different cell growth conditions (solid and liquid growth medium, pH of liquid growth medium, incubation temperature, cell storage method, different spore solutions, etc.) and different reaction conditions (cell disruption method, type of the reaction medium, pH of reaction medium, substrate concentration, cell concentration, agitation rate, temperature, time, etc.) with *R. oryzae* in batch bioreactor to investigate the effect of several parameters to the reaction. Then, the most important three reaction parameters (pH, time and cell concentration) among six parameters (substrate concentration, cell concentration, pH, temperature, agitation rate, time) and level of the other parameters ($C_0=1$ mM, $T=35^\circ\text{C}$, $KH=150$ rpm) were determined by using Plackett Burman Method. Response Surface Methodology was applied with three parameters and 54.7 ee % was obtained at optimum conditions which were pH 6.86 phosphate buffer, 101 g/L cell concentration, and 5.36 days reaction time. Furthermore, some investigations were also made for clarifying the biocatalytic deracemization mechanism of racemic propranolol.

April 2019, 206 pages

Key Words: β -blocker, propranolol, biocatalytic deracemization, enantioselectivity, *Rhizopus oryzae*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bilgi ve önerileriyle çalışmamı yönlendiren, yetiştirme ve gelişmeye katkıda bulunan, her konuda desteğini ve anlayışını hissettiğim ve kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), Tez İzleme Komitesi'nde bulunarak öneri ve katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Serpil TAKAÇ (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Tülin KUTSAL'a (Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), deneyim ve önerileriyle her zaman yol gösteren, ilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), güler yüzü ile pozitif enerji yayan ve desteğini her zaman hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Afife GÜVENÇ'e (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmamın başlangıç yıllarında disiplinli duruşunun yanında hayat enerjisiyle örnek aldığım, desteğini her zaman hissettiren, hoş anılarla yaşamımızı güzelleştiren ve ne yazık ki aramızdan erkenden ayrılan değerli hocam Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI'ya (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmam sırasında yaşadığım sıkıntılarda yardımlarıyla beni rahatlatan ve pozitif enerjisini örnek aldığım Dr. Nilüfer VURAL'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü), destekleriyle motivasyonumu artıran hocam Doç. Dr. Emine YAĞMUR'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), Akreditasyon Komisyonu'nda görev yaparken verdiğim emeklerin farkında olduğunu doktora çalışmam sırasındaki desteğiyle hissettiren hocam Prof. Dr. Hale HAPOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı, 14L0443004 numaralı “Biyokatalitik Olarak Enantiyomerik Safılıkta β -Blokör Üretimi” konulu ve 11Ö4343003 numaralı “S-Propranolol Üretiminde Kullanılan Halohidrinin Maya Biyokatalizörlüğünde Enantiyoseçimli Üretimi” konulu Bilimsel Araştırma Projeleri ile destekleyen Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Doktora çalışmamın başlangıcında kimyasal sentez aşamasında önerileriyle çalışmaya katkıda bulunan Prof. Dr. Ender ERDİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi), ^1H NMR analizlerini yapan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'na (Prof. Dr. Hakan GÖKER'e), mikroorganizmanın aktivitesinde düşüşe neden olan etkiler konusunda görüşlerine başvurulmuş Dr. Öğretim Üyesi Doruk ENGİN'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi) teşekkürlerimi sunuyorum.

FTIR analizlerini yapmasının yanında her zaman desteği ve iyi niyetiyle yanımda olan Arş. Gör. Dr. Yavuz GÖKÇE'ye, doktora sırasında sıkıntılı zamanlarımda yardıma koşan ve desteğini eksik etmeyen Öğr. Gör. Savaş YAĞLIKÇI'ya, çalışmamın son dönemlerinde desteğinden fazlaca güç aldığım, yüreğinin güzelliğini arkadaşlığına yansıtan Arş. Gör. Dr. Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPÇU'ya, doktora çalışmam boyunca desteğini hissettiğim ve fikirlerine değer verdiğim Dr. Öğretim Üyesi Furkan

SOYSAL'a, HRMS analizleri konusunda destek olan Arş. Gör. Zafer ÇIPLAK'a teşekkür ederim. İlkokuldaki arkadaşlığımızı hayatımızın bu aşamasına kadar taşıırken dostluğun hayatta ne kadar önemli bir duygu olduğunu hissettiren, sıkıntılı zamanlarımda hep yanımda olan Fatma ÖZTÜRK'e, lisanstaki arkadaşlığımızın kuvvetlenerek devam ettiği, kendi yoğunluğu içerisinde bile tez yazımı sırasında yardımlarını eksik etmeyen Dr. Gözde EKE'ye, doktora çalışmalarımız sırasında laboratuvarında beraber çalıştığımız, hoş sohbeti ve paylaşımlarından fazlaca mutluluk duyduğum, desteğinden güç aldığım canım arkadaşlarım Dr. Öğretim Üyesi Hilal KAZICI ve Kimya Yük. Müh. Ayşe AYGÜN'e, doktoramın çeşitli dönemlerinde deneylerime yardımcı olan, güler yüzleri ve yüreklerinin güzellikleriyle çalışma ortamını güzelleştiren canım öğrencilerim Elif UZUN, Kübra ÖZDEMİR ve Merve ALTUNTAŞ'a teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi doktora çalışmam sırasında da, moral ve motivasyonumu yüksek tutmama yardımcı olan, mesafeleri yok sayıp gerek arayarak gerek çeşitli sürprizlerle her daim yanımda olan, dert ortağım, canım kuzenim Duygu YÜCEDAĞ'a ve hayatımı renklendiren Zeynep Nur YÜCEDAĞ'a, her sıkıntıda yardıma koşan, tez yazımı sırasında desteğini esirgemeyen, varlığıyla güç veren canım kuzenim Can BEŞİKÇİ'ye teşekkür ederim.

Bu, yoğun emek isteyen ve meşakkatli çalışmam sırasında gerek benimle birlikte laboratuvarında sabahlayan, gerek hayatımı kolaylaştıran, zorluklara göğüs gererken yalnız olmadığımı hissettiren, benimle sevinip benimle endişelenen ama her daim desteğim olan, doktoramın başından sonuna tüm fedakarlık, anlayış ve hoşgörülerıyla beni kucaklayan canlarım annem Ayşe SONGÜR, babam Mustafa SONGÜR ve ablam Selma SONGÜR'e sonsuz teşekkür ediyorum. Bu çalışmamı, hayatım boyunca sevgi ve desteklerini devamlı hissettiğim, teşekkürün en büyüğünü hak eden, hayatımın en büyük şansları canım aileme ithaf ediyorum.

Rahime SONGÜR
Ankara, Nisan 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Kiral İlaçlar	4
2.2 Amino Alkoller	7
2.3 Beta Blokerlar.....	8
2.4 Beta Blokerların Temel Etki Mekanizması	12
2.5 Propranolol.....	13
2.6 Enantiyomerik Saflıkta β -Bloker Üretim Yöntemleri	14
2.7 Yükseltgenme-İndirgenme Tepkimeleri	17
2.7.1 Reaksiyon mekanizması.....	18
2.7.1.1 NAD(P)H bağlı dehidrojenaz için mekanizma	19
2.7.1.2 Flavın bağlı enzim için mekanizma	20
2.7.2 Kofaktör rejenerasyonu.....	21
2.7.2.1 Kofaktör rejenerasyonu için hidrojen kaynağı	22
2.7.2.1.1 Alkoller.....	23
2.7.2.1.2 Şekerler	23
2.7.2.1.3 Amino asit	24
2.7.2.1.4 Hidrojen	24
2.7.2.1.5 Elektrokimyasal rejenerasyon	25
2.7.2.1.6 Işık enerjisi ile rejenerasyon	26
2.7.2.2 Kofaktör rejenerasyonu için oksijen kaynağı.....	27
2.7.2.2.1 Moleküler oksijen.....	27
2.7.2.2.2 Elektrokimyasal	27

2.7.3 ADH.....	28
2.7.4 NADH oksidaz	29
2.7.5 Yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinde mikrobiyal tüm hücre kullanılması	31
2.7.6 Ardışık tepkimeler	32
2.8 Deneysel Tasarım	35
2.8.1 Plackett Burman tasarımı	38
2.8.2 Cevap yüzey yöntemi (RSM).....	40
2.8.2.1 Üç seviyeli faktöriyel tasarım.....	44
2.8.2.2 Box-Behnken tasarımı	45
2.8.2.3 Merkezi bileşik tasarım (Central composite design-CCD)	46
2.9 Kaynak Özetleri	50
2.9.1 Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile β -bloker öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi	50
2.9.2 Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu	54
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	73
3.1 Haloketonların Seçimli Mikrobiyal İndirgenmesi ile Propranololün Öncü Maddesi Olan Halohidrinlerin Üretimi	73
3.1.1 Halohidrin sentezi	73
3.1.2 Haloketon sentezi	74
3.1.3 Halohidrin ve haloketonun NMR analizi.....	75
3.1.4 Halohidrin ve haloketonun HPLC analizi	75
3.1.5 Halohidrin ve haloketonun FTIR analizi.....	76
3.1.6 <i>Pichia mexicana</i> CECT 11015 üreme koşulları.....	76
3.2 Rasemik Propranololün Biyokatalitik Derasemizasyonu	77
3.2.1 Kullanılan mikroorganizmaların üreme koşulları.....	77
3.2.1.1 <i>Lactobacillus kefir</i> NRRL B-1839	77
3.2.1.2 <i>Rhizopus oryzae</i> CBS 111718.....	78
3.2.1.2.1 Katı üreme ortamı.....	78
3.2.1.2.2 Spor çözeltisi hazırlanması.....	79
3.2.1.2.3 Sıvı üreme ortamı.....	79
3.2.1.3 <i>Rhizopus arrhizus</i>	80
3.2.1.3.1 Katı üreme ortamı.....	80
3.2.1.3.2 Spor çözeltisi hazırlanması.....	80
3.2.1.3.3 Sıvı üreme ortamı.....	80

3.2.1.4 <i>Rhodotorula glutinis</i>	81
3.2.1.5 <i>Lactobacillus brevis</i>	81
3.2.1.6 <i>Rhizopus arrhizus</i> NCIM 997	82
3.2.1.6.1 Katı üreme ortamı.....	82
3.2.1.6.2 Spor çözeltisi hazırlanması.....	82
3.2.1.6.3 Sıvı üreme ortamı	82
3.2.1.7 <i>Geotrichum candidum</i> NCIM 980	83
3.2.1.7.1 Katı üreme ortamı.....	83
3.2.1.7.2 Sıvı üreme ortamı	83
3.2.2 Hücrelere parçalama yöntemlerinin uygulanması.....	83
3.2.2.1 Ses ötesi dalga (SÖD) uygulama yöntemi	84
3.2.2.2 Mekanik parçalama uygulama yöntemi	84
3.2.3 ADH aktivitesi belirleme yöntemi.....	84
3.2.4 NADH oksidaz aktivitesi belirleme yöntemi.....	85
3.2.5 Biyotransformasyon tepkime koşulları.....	86
3.2.6 HPLC analizi	86
3.2.7 FTIR analizi.....	88
3.2.8 HRMS analizi	88
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	89
4.1 Haloketonların Seçimli Mikrobiyal İndirgenmesi ile Propranololün Öncü Maddesi Olan Halohidrinlerin Üretimi.....	89
4.1.1 Haloketonun indirgenme tepkimesi için uygun mikroorganizmanın seçilmesi ve hücre üreme eğrisinin oluşturulması	90
4.1.2 Halohidrin ve haloketonun sentezi	91
4.2 Rasemik Propranololün Biyokatalitik Derasemizasyonu	106
4.2.1 Enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	108
4.2.1.1 <i>L. kefir</i> 'de bulunan NADH oksidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	108
4.2.1.2 Farklı mikroorganizmaların ADH ve NADH oksidaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	109
4.2.2 Propranololün derasemizasyonuna mikroorganizma türünün etkisi	111
4.2.2.1 <i>Lactobacillus kefir</i> NRRL B-1839	112
4.2.2.2 <i>Rhodotorula glutinis</i> DSM 70398	115
4.2.2.3 <i>Lactobacillus brevis</i>	117
4.2.2.4 <i>Rhizopus arrhizus</i>	118
4.2.2.5 <i>Rhizopus oryzae</i> CBS 111718.....	123

4.2.2.6 <i>Rhizopus arrhizus</i> NCIM 997	126
4.2.2.7 <i>Geotrichum candidum</i> NCIM 980	128
4.2.3 <i>Rhizopus oryzae</i> CBS 111718 ile tepkime parametrelerinin belirlenmesi	130
4.2.3.1 SÖD uygulamalı	130
4.2.3.2 SÖD uygulamasız	135
4.2.4 Deneysel tasarım.....	153
4.2.4.1 Placket Burman yöntemi	154
4.2.4.2 Cevap yüzey yöntemi	159
4.2.5 Tepkime mekanizmasının belirlenmesi.....	169
5. SONUÇ.....	182
5.1 Haloketonların Seçimli Mikrobiyal İndirgenmesi ile Propranololün Öncü Maddesi Olan Halohidrinlerin Üretimi.....	182
5.2 Rasemik Propranololün Biyokatalitik Derasemizasyonu	183
KAYNAKLAR	190
EKLER.....	199
EK 1 <i>Pichia mexicana</i> Kuru Hücre Derişimine Göre Kalibrasyon Grafiği	200
EK 2 ADH ve NADH Oksidaz Enzim Aktivitesi Hesaplama Yöntemi	201
EK 3 Örnek Kromatogram	202
ÖZGEÇMİŞ.....	203

SİMGELER DİZİNİ

Adj R ²	Adjusted R ² (Düzeltilmiş R ² değeri)
C _p	Merkez noktadaki deney sayısı
C _R	Mutlak konfigürasyonu R olan enantiyomerin derişimi
C _S	Mutlak konfigürasyonu S olan enantiyomerin derişimi (Tepkime sonrasında ortamda kalan (S)-enantiyomerinin derişimi)
C _{So}	Mutlak konfigürasyonu S olan enantiyomerin başlangıç derişimi
C _o	Rasemik bileşiğin başlangıç derişimi (rasemik propranolol)
Da	Atomik kütle birimi
E	Enantiyomerik oran
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
k	Değişken sayısı
KH	Karıştırma hızı
N	Deney sayısı
Pred R ²	Predicted R ² (Tahmini R ² değeri)
T	Sıcaklık
U	Ünite
V	Tepkime hacmi
v	Örnek hacmi
x _i	Bağımsız değişkenler
Y	Cevap değişkeni
°C	Santigrat
% C	Dönüşüm (S-propranololün dönüşümü)
% CV	Varyasyon katsayısı
% ee	Enantiyomerik aşırılık

Yunan Alfabesi

β-bloker	Beta bloker
β _o	Sabit terim (model kayması)
β ₁ -β _i	Bağımsız değişkenlerin (parametrelerin) katsayıları
β _{ii}	İkinci dereceden parametrelerin katsayıları
β _{ij}	Etkileşim parametrelerinin katsayıları
ε	Deneysel hata ya da gürültü değeri
η	Beklenen verim

Kısaltmalar

ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotazolin-6-sülfonat
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ADH	Alkol dehidrojenaz
ANOVA	ANalysis Of VAriance (Varyans analizi)
ATP	Adenozin trifosfat
BBD	Box-Behnken Design (Box-Behnken Tasarımı)
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures Culture Collection
CCD	Central Composite Design (Merkezi Bileşik Tasarım)

CDER	The Center for Drug Evaluation and Research (İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi)
CDH	Laktoz sellobiyoz dehidrojenaz
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo (Spanish Type Culture Collection-İspanyol Kültür Koleksiyonu)
CR	Karbonil redüktaz
DKR	Dinamik kinetik rezolüsyon
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Alman Hücre Kültür Koleksiyonu)
EC	Enzyme Commission
EU	European Union
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FDA	US Food and Drug Administration (US Gıda ve İlaç Kurumu)
FDH	Format dehidrojenaz
FID	Alev iyonizasyon dedektörü
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC	Gaz kromatografi
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi)
KER	Keton redüktaz
ME	Merkaptoetanol
MEA	Malt ekstrakt agar
MRS	Man, Rogosa & Sharpe ortamı
MSM	Mineral tuzlar ortamı
MTBE	Methyl tert-butyl ether
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCIM	National Collection of Industrial Microorganisms
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NOX	NAD(P)H oksidaz
NRRL	Northern Regional Research Laboratory (Agricultural Research Service Culture Collection)
PDA	Patates dekstroza agar
PDB	Patates dekstroza besiyeri
PMSF	Fenilmetilsülfonil florit
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RSM	Response Surface Methodology (Cevap Yüzey Yöntemi)
SÖD	Ses ötesi dalga
SWORD	Survivors' Worries of Recurrent Disease
UV	Ultraviyole Spektroskopisi
UYM	Genel maya üreme ortamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Onaylanan yeni moleküler ilaçlarda kiralite durumu.....	6
Şekil 2.2 Tedavi edici alanda onaylanan ilaçların branşları.....	7
Şekil 2.3 β -adrenerjik blokerların kimyasal yapıları.....	11
Şekil 2.4 R-adrenalin ya da adrenerjik bloker ile reseptör etkileşimi	13
Şekil 2.5 Propranolol molekülü	14
Şekil 2.6 Tek enantiyomer olarak beta-blokerların üretimi için yol izi	14
Şekil 2.7 Kinetik rezolüsyon, asimetrik sentez ve derasemizasyon yöntemleri	16
Şekil 2.8 NAD(P)H bağlı dehidrojenaz için mekanizma	19
Şekil 2.9 Flavın bağlı enzim için mekanizma	20
Şekil 2.10 Kofaktör rejenerasyonu için yöntemler	21
Şekil 2.11 Kofaktör rejenerasyonu için alkol kullanılması.....	23
Şekil 2.12 Kofaktör rejenerasyonu için şeker kullanılması	24
Şekil 2.13 Kofaktör rejenerasyonu için aminoasit kullanılması	24
Şekil 2.14 Kofaktör rejenerasyonu için hidrojen kullanılması.....	25
Şekil 2.15 Kofaktör rejenerasyonu için elektrokimyasal yöntem	26
Şekil 2.17 Kofaktör rejenerasyonu için oksijen kullanılması	27
Şekil 2.18 Kofaktör rejenerasyonu için elektrokimyasal yöntem	28
Şekil 2.19 NOX enzimleri ile yükseltgenme tepkimeleri	30
Şekil 2.20 ADH/NOX çiftinin kullanıldığı bir sistem	31
Şekil 2.22 x_1 (sıcaklık) ve x_2 'nin (basınç) fonksiyonu olarak η 'yı (beklenen verim) gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi.....	42
Şekil 2.23 Bir cevap yüzeyinin izohips eğrisi çizimi	42
Şekil 2.24 İncelenen faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisi	44
Şekil 2.25 Tüm değişkenlerin 3 seviyeli olduğu deneysel tasarım	45
Şekil 2.26 (a) 2 değişkenli ($\alpha=1.41$) (b) 3 değişkenli ($\alpha=1.68$) optimizasyon için CCD.....	46
Şekil 2.27 CCD'i oluşturan öğeler	47
Şekil 2.28 İki değişkenli optimizasyonda ikinci dereceden bir modelden üretilen cevap yüzeyinin bazı profilleri.....	49
Şekil 2.29 N-(1-hidroksi-1-feniletıl) benzamid'in derasemizasyonu.....	56

Şekil 2.30 Rasemik N-(1-hidroksi-1-feniletıl) benzamid'in <i>C.echinulata</i> ile derasemizasyonunun zamanla ilerleyişı	57
Şekil 2.31 Yükseltgenme/indirgenme ile iki basamakta derasemizasyon	59
Şekil 2.32 Farklı sekonder alkollerin derasemizasyonu.....	60
Şekil 2.33 Farklı rasemik sekonder alkollerin eşanlı yükseltgenme-indirgenme döngüleri ile stereoinversiyonla derasemizasyonu ile S-alkol üretimi	61
Şekil 2.34 Farklı rasemik sekonder alkollerin eşanlı yükseltgenme-indirgenme döngüleri ile stereoinversiyonla derasemizasyonu ile R-alkol üretimi	61
Şekil 2.35 Fenil etanolün (1) stereoinversiyonu	62
Şekil 2.36 Çift enzimli sistem ile derasemizasyon	63
Şekil 2.37 (S)-1-(1-naftıl)etanolün <i>Candida parapsilosis</i> hücreleri ile stereoinversiyonu	64
Şekil 2.38 <i>C. albicans</i> hücreleri kullanılarak stereoinversiyonla 1-fenil-1,2-etandiolün derasemizasyonu için önerilen mekanizma.....	66
Şekil 2.39 <i>C. albicans</i> hücreleri (resting cell) ile rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonu için önerilen mekanizma.....	70
Şekil 2.40 Her iki enantiyomeri ayrı olarak elde etmek için <i>C. albicans</i> ve <i>L. brevis</i> 'in ardışık olarak kullanılmasıyla rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonu	71
Şekil 2.41 Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün çıkış maddesi olan halohidrinlerin üretimi.....	72
Şekil 2.42 Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi.....	72
Şekil 4.1 Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi	89
Şekil 4.2 <i>Pichia mexicana</i> hücre üreme eğrisi	91
Şekil 4.4 Sentezlenen haloketonun ¹³ C NMR analizi sonucu.....	93
Şekil 4.5 Halohidrin (10 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı.....	95
Şekil 4.6 Halohidrin (1 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı.....	96
Şekil 4.7 Halohidrin (0.5 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı.....	96
Şekil 4.9 Halohidrin (20 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı.....	97
Şekil 4.10 Halohidrin (50 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı.....	97
Şekil 4.13 Sentezlenen haloketonun ¹ H NMR analizi sonucu	102
Şekil 4.14 Sentezlenen halohidrinin FTIR analizi sonucu	103
Şekil 4.15 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-olün IR Spektrumu.....	104

Şekil 4.16 Sentezlenen haloketonun FTIR analizi sonucu.....	105
Şekil 4.17 Haloketon ve halohidrinin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması	105
Şekil 4.18 Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi.....	107
Şekil 4.19 <i>L. kefir</i> 'de NADH oksidaz aktivitesi ölçümü sırasında absorbansın zamanla değişimi.....	108
Şekil 4.20 Farklı mikroorganizmalarda ADH aktivitesi ölçümü sırasında absorbansın zamanla değişimleri	110
Şekil 4.21 Farklı mikroorganizmalarda NADH oksidaz aktivitesi ölçümü sırasında absorbansın zamanla değişimleri	110
Şekil 4.22 <i>L. kefir</i> ile rasemik propranololün yükseltgenmesine süre ve tepkime kabının etkisi	114
Şekil 4.23 <i>L. kefir</i> ile rasemik propranololün yükseltgenmesinde tepkime ortamının etkisi	115
Şekil 4.24 <i>R. glutinis</i> ile rasemik propranololün üreme ortamında yükseltgenmesine parçalama yönteminin etkisi.....	116
Şekil 4.25 <i>R. glutinis</i> ile rasemik propranololün tampon ortamında yükseltgenmesine parçalama yönteminin etkisi.....	116
Şekil 4.26 <i>L. brevis</i> ile rasemik propranololün yükseltgenmesine SÖD ve tepkime ortamının etkisi.....	117
Şekil 4.27 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün üreme ortamında (PDB) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	118
Şekil 4.28 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	119
Şekil 4.29 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün üreme ortamında (Damle vd. 2000) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi.....	120
Şekil 4.30 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	120
Şekil 4.31 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün derasemizasyonuna üreme ortamına katılan propranolol etkisi	121
Şekil 4.32 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün üreme ortamında (Damle vd. (2000)+propranolol) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	122
Şekil 4.33 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	122
Şekil 4.34 <i>R. oryzae</i> ile rasemik propranololün üreme ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	123

Şekil 4.35 <i>R. oryzae</i> ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	124
Şekil 4.36 <i>R. oryzae</i> ile rasemik propranololün üreme ortamında (PDB) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	125
Şekil 4.37 <i>R. oryzae</i> ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	126
Şekil 4.38 <i>R. arrhizus</i> ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yöntemi ve tepkime ortamının etkisi.....	127
Şekil 4.39 <i>R. arrhizus</i> sıvı üreme ortamının rasemik propranololün derasemizasyonuna etkisi.....	128
Şekil 4.40 <i>G. candidum</i> ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yöntemi ve tepkime ortamının etkisi.....	129
Şekil 4.41 <i>G. candidum</i> sıvı üreme ortamının rasemik propranololün derasemizasyonuna etkisi.....	130
Şekil 4.42 Substrat derişiminin etkisi	131
Şekil 4.43 Tepkime süresinin etkisi	132
Şekil 4.44 Tepkimedeki fosfat tamponunun pH'ının etkisi	133
Şekil 4.45 SÖD uygulama süresinin etkisi.....	134
Şekil 4.46 MgCl ₂ derişiminin etkisi	135
Şekil 4.47 Glikozlu MEA 'da üretilen <i>R. oryzae</i> ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	136
Şekil 4.48 Glikozsuz MEA 'da üretilen <i>R. oryzae</i> ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi	137
Şekil 4.49 Glikozlu ve glikozsuz MEA 'da üretilen <i>R. oryzae</i> ile rasemik propranololün derasemizasyonuna katı üreme ortamı ve parçalama yönteminin etkisi	137
Şekil 4.50 Glikozsuz MEA'daki <i>R. oryzae</i> 'nin stoklama sıcaklığının rasemik propranololün derasemizasyonuna etkisi	139
Şekil 4.51 Hücrelerin parçalanma durumunun etkisi	140
Şekil 4.52 Hücre derişiminin etkisi.....	141
Şekil 4.53 Substrat derişiminin etkisi	142
Şekil 4.54 Karıştırma hızının etkisi.....	143
Şekil 4.55 Üreme ortamının pH'ının etkisi	144
Şekil 4.56 Tepkime ortamının (fosfat tamponunun) pH'ının etkisi.....	145
Şekil 4.57 Tepkime ortamının sıcaklığının etkisi	145

Şekil 4.58 Hücrelerin tamponla yıkanma durumunun etkisi.....	146
Şekil 4.59 Farklı spor çözeltileri kullanılmasının etkisi.....	147
Şekil 4.60 Üreme ortamının sıcaklığının etkisi.....	148
Şekil 4.61 Mikroorganizmanın farklı yedeklerinden çoğaltılmasının etkisi.....	150
Şekil 4.62 Tepkime sıcaklığının etkisi	151
Şekil 4.63 Tepkime süresinin etkisi	152
Şekil 4.64 Farklı katı üreme ortamları, farklı sıcaklıklarda üretilen hücrelerin tepkimeye etkisi	153
Şekil 4.65 Elde edilen Pareto Grafiği.....	159
Şekil 4.66 Elde edilen deneysel veriler ile modelden tahmin edilen değerlerin değişimi	164
Şekil 4.67 pH ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin üç boyutlu cevap yüzey grafiği (mikroorganizma derişimi=100 g/L)	165
Şekil 4.69 Mikroorganizma derişimi ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin üç boyutlu cevap yüzey grafiği (pH=7)	166
Şekil 4.70 pH ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin izohips eğrileri ile gösterimi (mikroorganizma derişimi=100 g/L).....	166
Şekil 4.71 pH ile mikroorganizma derişiminin % ee değerine ikili etkisinin izohips eğrileri ile gösterimi (süre=6 gün)	167
Şekil 4.72 Mikroorganizma derişimi ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin izohips eğrileri ile gösterimi (pH=7).....	168
Şekil 4.73 Keton tespiti için HPLC analiz sonuçları karşılaştırılması	171
Şekil 4.74 Keton tespiti için HPLC analiz sonuçları karşılaştırmasının yakınlaştırılmış hali.....	171
Şekil 4.75 Rasemik propranololün <i>R. oryzae</i> ile derasemizasyonunda tepkimedeki bileşenlerin miktarlarının zamanla değişimi	173
Şekil 4.76 Rasemik propranololün <i>R. oryzae</i> ile derasemizasyonunda 2. güne ait HPLC analiz sonucu.....	173
Şekil 4.77 Rasemik propranololün <i>R. oryzae</i> ile derasemizasyonunda farklı tepkime sürelerindeki HPLC analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	174
Şekil 4.78 Merkaptoetanol etkisi.....	175
Şekil 4.79 Farklı tepkime kaplarının etkisi	176
Şekil 4.80 Tepkime ortamına glikoz eklenmesinin etkisi	177
Şekil 4.81 Tepkime ortamına glikoz eklenmesinin etkisinin gözleendiği analiz sonuçlarının karşılaştırılması	177

Şekil 4.82 Substrat olarak 0.5 mM saf R-propranolol kullanıldığında (gri çizgi), 0.5 mM saf S-propranolol kullanıldığında (kırmızı çizgi), 1 mM rasemik propranolol kullanıldığında (yeşil çizgi) gerçekleştirilen tepkimelerin FTIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması	179
Şekil 4.83 Substrat olarak 0.5 mM saf R-propranolol kullanıldığında (siyah çizgi), 0.5 mM saf S-propranolol kullanıldığında (kırmızı çizgi), 1 mM rasemik propranolol kullanıldığında (mavi çizgi) gerçekleştirilen tepkimelerin FTIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması	179
Şekil 4.84 Substrat olarak 1 mM rasemik propranolol kullanıldığında elde edilen HRMS analiz sonucu	180
Şekil 4.85 Substrat olarak 0.5 mM saf S-propranolol kullanıldığında elde edilen HRMS analiz sonucu	181
Şekil 4.86 RSM’de yüksek sonuç elde edilen bir örneğin HRMS analiz sonucu	181

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tasarım yöntemi seçimi.....	38
Çizelge 2.2 Placket Burman Tasarımı.....	39
Çizelge 3.1 HPLC analiz koşulları.....	75
Çizelge 3.2 <i>Pichia mexicana</i> (CECT 11015) için üreme ortamı bileşimi.....	76
Çizelge 3.3 <i>L. kefir</i> için üreme ortamı bileşimi.....	78
Çizelge 3.4 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) için glikozlu malt ekstrakt agar (MEA) ortamı.....	78
Çizelge 3.5 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) için glikozsuz malt ekstrakt agar (MEA) ortamı.....	79
Çizelge 3.6 <i>Rhizopus oryzae</i> (CBS 111718) için sıvı üreme ortamı.....	79
Çizelge 3.7 <i>Rhizopus oryzae</i> için sıvı üreme ortamı (PDB).....	80
Çizelge 3.8 <i>Rhizopus arrhizus</i> için sıvı üreme ortamı (Damle vd. 2000).....	81
Çizelge 3.9 UYM ortam bileşimi.....	81
Çizelge 3.10 <i>Rhizopus arrhizus</i> için sıvı üreme ortamı (Damle vd. 2000).....	82
Çizelge 3.11 <i>Geotrichum candidum</i> için sıvı üreme ortamı (Damle vd. 2000).....	83
Çizelge 3.12 HPLC analiz koşulları.....	87
Çizelge 4.1 <i>L. kefir</i> 'deki NADH oksidaz aktiviteleri.....	109
Çizelge 4.2 ADH aktiviteleri.....	111
Çizelge 4.3 NADH oksidaz aktiviteleri	111
Çizelge 4.4 <i>L. kefir</i> ile rasemik propranololün yükseltgenmesi.....	112
Çizelge 4.5 <i>L. kefir</i> ile rasemik propranololün yükseltgenmesi.....	113
Çizelge 4.6 Plackett Burman Yöntemi tasarım parametreleri ve seviyeleri	155
Çizelge 4.7 Plackett Burman Tasarım matrisi	156
Çizelge 4.8 Plackett Burman Tasarımı sonucunda elde edilen varyans analizi (ANOVA) sonuçları	157
Çizelge 4.9 ANOVA sonuçlarına göre elde edilen standart sapma, R^2 ve yeterli kesinlik değerleri	158
Çizelge 4.10 Cevap Yüzey Yöntemi Box-Behnken tasarım parametre ve seviyeleri	160
Çizelge 4.11 Cevap Yüzey Yöntemi Box-Behnken tasarım matrisi ve elde edilen cevap değerleri	161

Çizelge 4.12 Cevap Yüzey Yöntemi sonucunda elde edilen varyans analizi (ANOVA) sonuçları	162
Çizelge 4.13 Cevap Yüzey Yöntemi sonucunda elde edilen standart sapma, R^2 ve yeterli kesinlik ve varyasyon katsayısı değerleri.....	163



1. GİRİŞ

İlaç tedavisinde tek enantiyomerin kullanılması gerekliliği, otoriteleri ilaçlar üzerindeki düzenlemeleri sıkılaştırmaya yöneltmiştir. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi, rasemik ilaçların izinleri için enantiyomerik saflıkta üretim çalışmalarını ve gerekçelerini istemektedir. Bu değerlendirmeler ilaç teknolojisinde gelişmeler sağlamış olup tek enantiyomer elde etmek amacıyla pek çok çalışma ortaya konmuştur (Agustian vd. 2010). Tek enantiyomer halindeki ilaçların, dünya çapında onaylanan yeni ilaçlara oranı 1992’de yaklaşık % 40 iken 2010’da yaklaşık % 70’lere yükselmiştir. Fakat yine de yeni rasemik ilaçlar tamamen bitmemiştir (Calcaterra ve D’Acquarica 2018).

Toplumda kardiyovasküler hastalıklara çok sık rastlanılır ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok ilaç kiraldır (Mehvar ve Brocks 2004). β -blokerlar da kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan çok önemli bir ilaç grubudur (Zelaszczyk ve Kononowicz 2007). Hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları (prekardiyal rahatsızlığa bağlı göğüs ağrısı), kalp ritim bozuklukları, kalp yetmezliği, akut koroner sendrom hastalıklarının tedavisinde ve ayrıca migren ağrıları, glokom, yüksek tansiyona sebep olan bir böbreküstü bezi vasküler tümörü, tiroid bezinin aşırı faaliyetinden doğan durumlar ile sempatik sinir sistemi ile ilgili diğer hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar (Kennedy 2001, Mehvar ve Brocks 2004, Agrawal ve Patel 2005, Zelaszczyk ve Kononowicz 2007).

β -blokerların enantiyomerleri çoğunlukla farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahiptir. Bu nedenle β -bloker enantiyomerleri ayrı ayrı kullanılmalıdır. Çünkü daha az aktif olan enantiyomer (distomer) β -bloker etkisi vermemekte, tüm ilaç seçimliliğini azaltmakta ya da yan etki oluşturabilmektedir. β -blokerların büyük çoğunluğunda daha aktif enantiyomer S-enantiyomeridir. Genellikle, eutomer (daha aktif olan enantiyomer) distomeren 10-500 kat daha aktiftir (Agustian vd. 2010). Yapılan bir SWORD (Survivors’ Worries of Recurrent Disease) çalışması ile sotalolün distomerinin miyokardiyal damar tıkanıklığı olan hastaların ölüm oranını artırdığı saptanmıştır. Diğer β -blokerların daha az aktif olan enantiyomerlerinin genel olarak bu kadar ciddi yan etkileri saptanmasa da istenen tedavi edici etkileri olmayan bu

enantiyomerlerin yan etki oluşturabilecek gereksiz bir izomerik yükleme olduğu düşünülmektedir (Zelaszczyk ve Kononowicz 2007).

β -blokerların sadece küçük bir bölümü tek enantiyomer halinde satılmaktadır (Agustian vd. 2010). β -adrenerjik bloker aktivitesine sahip bileşiklerden en önemlileri propranolol, atenolol, metoprolol ve alprenololdür. Bu önemli β -blokerlar arasından propranolol; hipertansiyon, migren ağrısı, prekardiyal rahatsızlığa bağlı göğüs ağrısı, kalp ritim bozuklukları, glokom (<http://www.oytunerbas.com.tr/farmakoloji-giris-otonom-sinir-sistemi/17/>, 2018), yüksek tansiyona sebep olan bir böbreküstü bezi vasküler tümörü tedavisi için kliniklerde kullanılmaktadır (Santoro vd. 2001, Kamal vd. 2004). Propranolol ayrıca hipertiroid, anksiyete bozuklukları ve çarpıntı tedavisinde de kullanılmaktadır (Al-Majed vd. 2017). Bir sekonder amino-alkol olan propranolol (1-izopropil amino-3-(1-naftoksi)-2-propanolol) ticari olarak rasemik karışım halinde satılmaktadır. Fakat rasemik halde astım hastalarında bronşların daralması ve hipertansiyon hastalarında diyabete neden olan yan etkilere sahiptir. Bu etkiler R-enantiyomerinden kaynaklanmaktadır (Barbosa vd. 2010). Fakat, R-propranolol de tiroksinin (T_4) triiyodotriyone (T_3) dönüşümünü inhibe ederek kandaki T_3 derişiminin azalmasını sağladığından hipertiroid tedavisinde (Stoschitzky vd. 1998) ve ayrıca doğum kontrol haplarında (Kong vd. 2015) kullanılmaktadır. Bu nedenle enantiyomerik saflıkta R ve S-propranololün elde edilmesi için farklı yöntemler araştırılmaktadır. Enantiyomerik saflıkta başlangıç maddelerinin ve doğal ürünlerin sentezi için sentetik ara ürünlerin hazırlanmasında biyokatalizörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Sugai vd. 2018).

Bu doktora çalışmasında, farmasötik açıdan önem taşıyan, özellikle kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan β -blokerlardan biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi ve rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi olmak üzere iki yöntem incelenmiştir. Bu yöntemlerden rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi konusunda derasemizasyon tepkimesini katalizleyecek olan

enzim kaynağı olarak uygun mikroorganizma araştırılmış ve *Rhizopus oryzae* CBS 111718 olarak belirlenmiştir. *R. oryzae* kullanılarak en uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesi, deneysel tasarım yöntemleri ile parametrelerin optimizasyonu ve mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik bilgiler elde edilmesi amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kiral İlaçlar

Birçok bileşiğin özelliği ve aktivitesi üzerinde kiralitenin önemi saptandığından farmasötik, değerli kimyasal (fine chemicals) ve gıda endüstrilerinde optikçe saf bileşiklerin sentezine olan ilgi gittikçe artmaktadır. Bu yüzden kiral moleküllerin elde edilmesi için yeni proseslerin geliştirilmesi hala organik sentezde önem taşımaktadır ve değerli kimyasallar ile ilaçların biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi gelişmekte olan bir araştırma alanıdır. Enzimlerin yüksek kimyasal, bölgesel ve enantioseçimlilik göstermelerine bağlı olarak biyolojik olarak aktif bileşiklerin ve kiral yapı bloklarının üretimi için biyotransformasyon alanına ilgi artmaktadır. Bu da daha çevreci ve ekonomik olan ilgi çekici proseslerin gelişmesine yol açmaktadır (Solano vd. 2012).

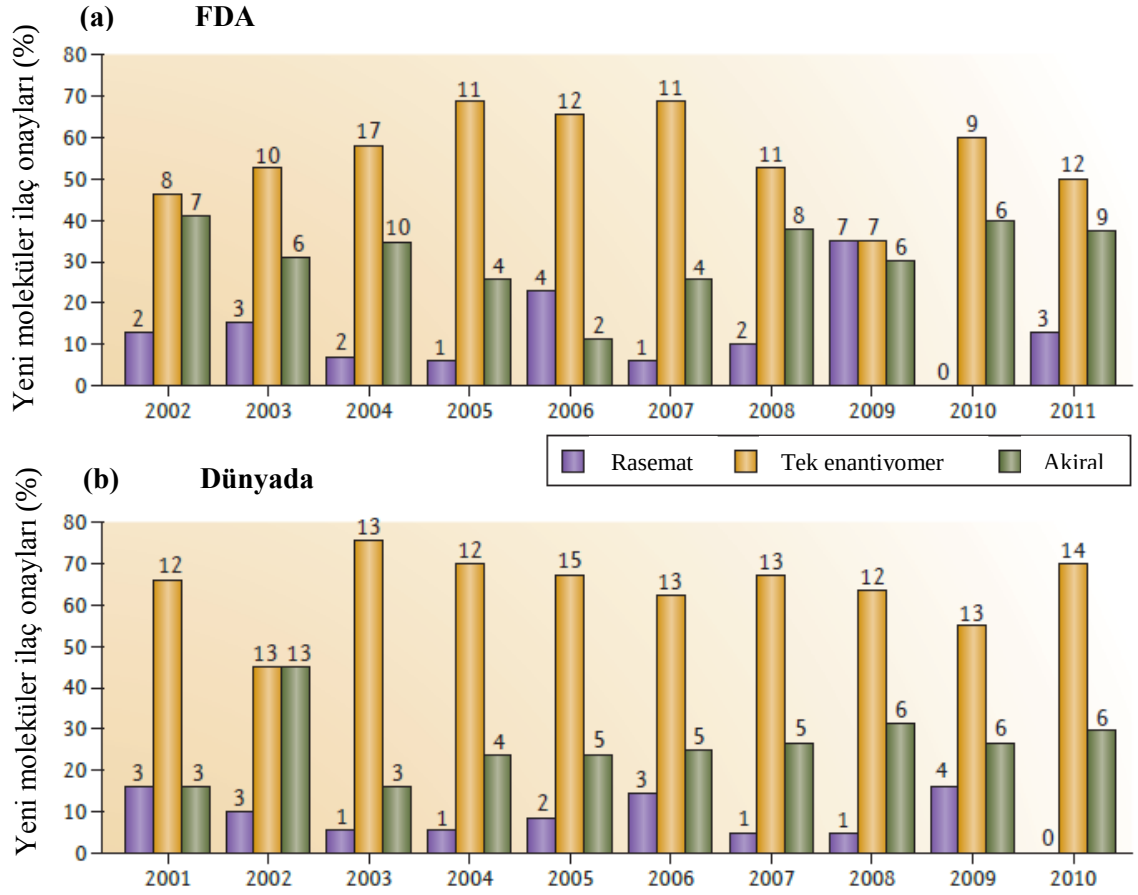
Bununla birlikte son 10 yılda US (United States), Japonya ve EU (European Union) tarafından onaylanan çevresel kısıtlamalar ve REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) düzenlemesi değerli kimyasal endüstrisinde büyük bir tartışmaya yol açmıştır. Bu şekilde yeşil kimya felsefesinin; biyokütleden elde edilen kimyasalların endüstriyel kullanımını, yeşil çözücüler ve endüstriyel proseslerin daha sürdürülebilir kullanımını desteklemesi endüstriyel araştırmaları etkilemektedir. Daha yeşil endüstriyel proseslerin geliştirilmesindeki anahtar başarı genel bir organik sentez planındaki katalitik teknolojilerin (kimyasal ya da enzimatik) etkili entegrasyonudur. Bu bağlamda; biyokatalizörler enantiyomerik saflıkta ilaç ve gıda katkı maddeleri olarak kullanılan kiral yapı bloklarının sentezi için özellikle yeşil kimya içeriğinde çok cazip özellikler göstermektedir. Bunlar; ılımlı reaksiyon koşulları (fizyolojik pH ve sıcaklık, her ne kadar birçok yeşil çözücü kullanılabilse de genel reaksiyon ortamı olarak su kullanılması) ve çevreye dost katalizörlerin (enzim ya da hücre) çok fonksiyonlu moleküllerde yüksek aktivite ile kimyasal, bölgesel ve stereoseçimlilik göstermesidir. Bu özellikler prosesin daha kısa, daha az atık üreten ve bu yüzden de hem çevresel hem de ekonomik olarak geleneksel yoldan daha cazip olmasını sağlar (Solano vd. 2012).

Yüksek stereoseçimli dönüşümlerin geliştirilme olasılığına bağlı olarak akademik ve

endüstriyel sektörde biyokatalizörler önem kazanmıştır. Doğada çeşitliliği ve bolluğuna bağlı olarak çok çeşitli kimyasal tepkimeleri katalizlemek ve stereoseçimli dönüşümleri geliştirmek için enzimlerin kiral özellikleri onları güçlü araçlar yapmaktadır (Albarran-Velo vd. 2018).

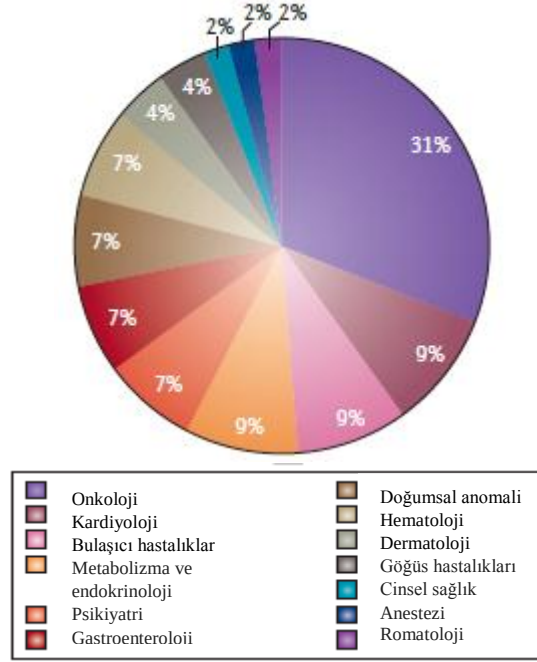
Kiral ilaçlar farmasötiklerin en önemli kategorilerinden biridir. Birçok farmasötik rasemat olarak satılmaktadır. Fakat genellikle rasemattaki sadece bir enantiyomer farmakolojik ya da biyolojik olarak istenen aktivitededir. Diğer enantiyomer çoğunlukla inaktif, daha düşük aktivitede ya da yan etki/toksik etki gösterebilir niteliktedir. Kısaca, enantiyomerler farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip olabilir (Ribeiro vd. 2014). Bu yüzden endüstride istenen enantiyomerin enantiyomerik saflıkta üretimi gereklidir (Kumar vd. 2016).

Agranat vd. (2012) çalışmalarında kiral ilaçların gelişmesindeki trendler ile ilgili verilerin istatistiksel bir değerlendirmesini yaparak temel bir katkı sağlamışlardır (Şekil 2.1). Buna göre tek enantiyomer halindeki ilaçların, onaylanan yeni moleküler ilaçlardaki oranı hızla artmaktadır. Bu oran, 1992’de dünya çapında onaylanan yeni ilaçlara göre yaklaşık % 40 iken 2010’da yaklaşık % 70’lere yükselmiştir. Fakat yine de yeni rasemik ilaçlar tamamen bitmemiştir (Calcaterra ve D’Acquarica 2018).



Şekil 2.1 Onaylanan yeni moleküler ilaçlarda kiralite durumu (a) 2002-2011 yılları arasında FDA tarafından onaylanan yeni moleküler ilaçların kiralite durumlarına göre yüzdesi (y ekseninde) ve sayısı (sütunların üzerinde) (b) 2001-2010 yılları arasında dünya çapında onaylanan yeni moleküler ilaçların kiralite durumlarına göre yüzdesi (y ekseninde) ve sayısı (sütunların üzerinde) (Agranat vd. 2012)

Son zamanlarda kiral ilaçların hızlı artışını görmek amacıyla FDA'daki (US Gıda ve İlaç Kurumu / US Food and Drug Administration) CDER (İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi / The Center for Drug Evaluation and Research) ajansının verileri incelenerek 2015 FDA ilaç onaylarına odaklanılmıştır. Buna göre; CDER onaylanan ilaç listesinde, tedavi edici alanda antikanser ilaçlarının oranı önceki yıllarda olduğu gibi 2015'te de baskın gelmiştir (% 31). Kardiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları ise % 9 oranlarıyla onkolojiden sonra ikinci sırada gelmektedirler (Şekil 2.2) (Calcaterra ve D'Acquarica 2018).



Şekil 2.2 Tedavi edici alanda onaylanan ilaçların branşları (Mullard 2016)

Farmasötik sektörde ruhsatlandırma ajanslarının sıkı kuralları ile kiral ilaçların enantiyomerleri hakkındaki patent koruma teşvikleri nedeniyle enantiyomerik saflıktaki ürünlere yönelim önem kazanmıştır. Farmasötik, tarım, değerli kimyasallar ve gıda endüstrisinde kimyasal girdilerin üretiminde enantiyomerik saflıktaki kiral bileşiklerin üretimi zorunludur. Bununla birlikte farmasötik ilaç endüstrisinde kiral ilaçların kullanımının 2020'ye kadar yaklaşık % 95'lere artacağı beklenmektedir. Benzer şekilde tarım, gıda ve değerli kimyasal endüstrilerinde de kiral bileşiklerin oranı artmaktadır (Seddiği vd. 2017).

2.2 Amino Alkoller

Enantiyomerik saflıktaki amino alkoller tıbbi kimyada yaygın olarak kullanılan önemli bir bileşik sınıfıdır. Amino alkoller, biyolojik ve farmakolojik olarak aktif bileşiklerin sentezi için önemli yapı bloklarıdır. Biyolojik olarak aktif bileşiklerin (adrenalin, beta adrenerjik blokerlar, anti-astım ilaçları, amfenikol antibiyotikleri ve birçok biyoaktif doğal üründe) genel yapı motifi genel olarak 2-amino-1-aril alkol yapısı olarak görülmektedir. Adrenerjik reseptörler ile bu yapı-aktivite ilişkisi 2-amino-1-fenil etanol

iskeletinde amino grubu ve fenil halkanın reseptörler üzerinde aktiflik için temel yapısal özellikler olduğunu göstermektedir. Bu yüzden bazı yeşil kimya kriterlerine uyulurken, enantiyomerik saflıkta benzer aminoalkoller üretmek için yeni eko-uyumlu protokollerin tasarımı devam etmektedir. En etkili hedef protokollerinden biri biyokatalizdir. Bu, yüksek kimyasal, bölgesel ve stereoseçimlilikle iki ve/veya polifonksiyonel moleküllerin elde edilmesi için sürdürülebilir ve temiz bir yoldur. Farmasötik ve sentetik uygulamalardaki sıkı kısıtlamalar nedeniyle kiral aminoalkoller yüksek enantiyomerik saflıkta istenir. Bu da yüksek seçimlilikte asimetrik sentezle ya da biyokatalitik yolla daha kolay sağlanabilir (Alalla vd. 2016). Amino alkol yapısı antibiyotik, alkaloid, enzim inhibitörleri ve β -blokerler gibi biyolojik olarak aktif doğal ve sentetik moleküllerde yaygın yapısal bir motiftir (Gupta ve Mahajan 2018).

2.3 Beta Blokerlar

Toplumda kardiyovasküler hastalıklara çok sık rastlanılır ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok ilaç kiraldir (Mehvar ve Brocks 2004). Amino alkol yapısında olan β -blokerlar da kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan çok önemli bir ilaç grubudur (Zelaszczyk ve Kononowicz 2007). Hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları (prekardiyal rahatsızlığa bağlı göğüs ağrısı), kalp ritim bozuklukları, kalp yetmezliği, akut koroner sendrom hastalıklarının tedavisinde, tekrar eden kalp krizinin önlenmesinde (<https://docplayer.net/15536477-Using-beta-blockers-to-treat-high-blood-pressure-and-heart-disease.html>, 2018) ve ayrıca migren ağrıları, glokom, yüksek tansiyona sebep olan bir böbreküstü bezi vasküler tümörü, tiroid bezinin aşırı faaliyetinden doğan durumlar ile sempatik sinir sistemi ile ilgili diğer hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kennedy 2001, Mehvar ve Brocks 2004, Agrawal ve Patel 2005, Zelaszczyk ve Kononowicz 2007). Tedavi edici etkilerinin yanında bu bileşikler nörolojik etkileri yatıştırıcı, anksiyete ve asabiyeti azaltıcı, motor performansını dengeleyici etkiler de sergilemektedir (Ribeiro vd. 2018).

β -blokerlar son yarım yüzyıldır en çok kullanılan ve çok yönlü ilaçlardan biri olmuştur. Son birkaç yılda, kanser önleyici ilaçlar olarak kullanımları için yeni bir potansiyel

ortaya çıkmıştır. Geriye dönük çeşitli vaka kontrol çalışmaları; kanser tanısı öncesi β -blokerların kullanılmasının küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, melanom, göğüs, yumurtalık, pankreas ve prostat kanserlerine karşı önleyici ve koruyucu etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Fakat, deneysel ve klinik gözlemler, hala yetersizdir. Bununla birlikte, bulgular bazı β -blokerların belirli kanser türlerine karşı olumlu rol oynadığına işaret etmektedir. Diyabetik hastalarda bile, β -bloker kullanımıyla önemli ölçüde azalmış bir genel kanser riski rapor edilmiştir. Tüm kanser ölümlerinin % 90'ından fazlası, birincil kanserler nedeniyle değil, metastazlardan kaynaklanmaktadır ve kanser hücrelerinin orijinal bölgeden göçü, metastazlar için ön şarttır. β -blokerların kullanılmasının tümör ilerlemesini azaltmada, metastaz oluşumunu, kanserin yinelenmesini ve kanserden ölüm oranını azaltmada yardımcı olduğuna ve çeşitli kanser türlerinden hastalıksız sağkalım şansını arttırdığına yönelik artan miktarda klinik kanıt vardır. β -blokerların bir antikanser etkisi yarattığı ve kanser hastalarının sağkalımının iyileştirildiği gözlemi, β -blokerların çeşitli kanserlerde rolünün araştırılması için yeni bir pencere açmıştır (Akbar ve Alsharidah 2014).

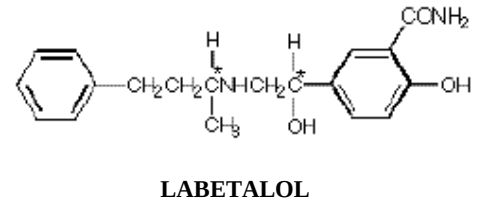
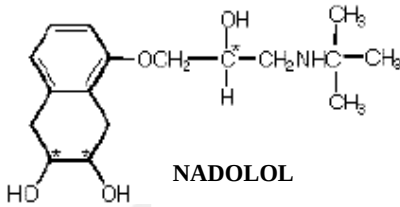
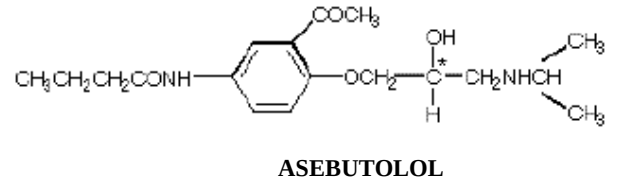
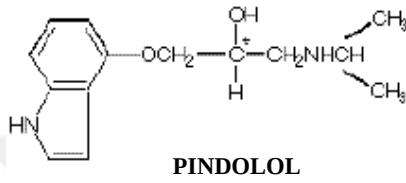
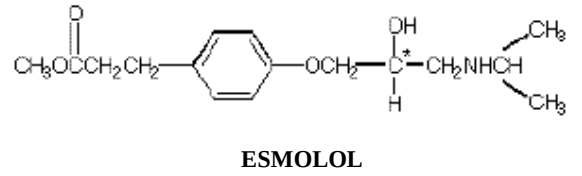
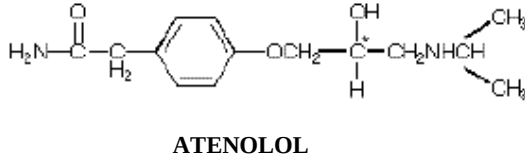
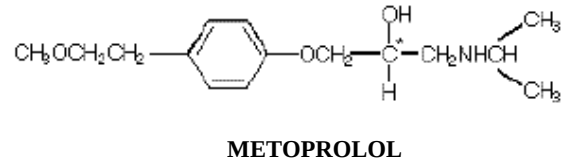
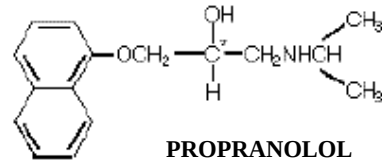
Dünyadaki toplam ölüm sayısının % 20-50'si kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanmaktadır (Zelazczyk ve Kononowicz 2007). β -bloker kullanan hastalarda yapılan araştırmalar bu ilaçların ölüm riskini önemli derecede azalttığını göstermiştir (Kennedy 2001).

Tüm beta blokerler yüksek kan basıncına karşı etkilidirler. Beta blokerlar 2009 yılında Amerika'da en yaygın reçetelenen ilaç sınıfında 5. sıradadır (yaklaşık 128 milyon reçete ile). Beta blokerlar yüksek kan basıncı ve kalp hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan reçeteli ilaçlar sınıfından sadece biridir. Diğer birçok sınıf da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlar diüretikler, ACE inhibitörleri, alfa blokerlar, anjiyotensin-reseptör blokerları, kalsiyum kanal blokerlarıdır. Bu ilaçlar ve beta blokerlar çoğunlukla birlikte kullanılırlar. Gerçekten, hipertansiyon hastası birçok insan kan basınçlarını normal seviyeye düşürmek için iki ya da daha fazla ilaca ihtiyaç duyarlar.

Beta blokerlar yüksek kan basıncına ve aşağıdaki koşullardan bir ya da daha fazlasına sahip insanlar için diğer ilaçlar arasından ilk seçenektir: Anjina, kalp krizi öyküsü, kalp yetmezliği (kalp kası zayıflığı olduğu zaman), kalp ritm bozukluğu, migren ağrısı.

Beta blokerlar kalp ve kan damarlarında adrenalinin etkisini bloke ederek çalışır. Adrenalin kalp hızını artırır, kalp kasının daha kuvvetli kasılmasına neden olur ve vücuttaki atardamarların daralmasına neden olur. Tüm bu etkiler kan basıncının yükselmesine yol açar. Betablokerların adrenalinin etkilerini bloke etmesiyle kalp yavaşlar, iş yükü azalır ve bu da kan basıncının azalmasına yardım eder (<https://docplayer.net/15536477-Using-beta-blockers-to-treat-high-blood-pressure-and-heart-disease.html>, 2018).

β -adrenerjik blokerların tümü en az bir asimetric merkeze sahiptir ki bu durum ilaca optikçe aktiflik vermektedir. Ayrıca bu ilaçların genel bir özelliği yapılarında en az bir aromatik halkaya sahip olmalarıdır (Şekil 2.3) (Mehvar ve Brocks 2004). β -blokerların enantiyomerleri çoğunlukla farklı farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahiptir. Bu nedenle β -bloker enantiyomerleri ayrı ayrı kullanılmalıdır. Çünkü daha az aktif olan enantiyomer (distomer) β -bloker etkisi vermemekte, tüm ilaç seçimliliğini azaltmakta ya da yan etki oluşturabilmektedir. β -blokerların büyük çoğunluğunda daha aktif enantiyomer S-enantiyomeridir. Genellikle, eutomer (daha aktif olan enantiyomer) distomerden 10-500 kat daha aktiftir (Agustian vd. 2010). Yapılan bir SWORD çalışması ile sotalolün distomerinin miyokardiyal damar tıkanıklığı olan hastaların ölüm oranını artırdığı saptanmıştır. Diğer β -blokerların daha az aktif olan enantiyomerlerinin genel olarak bu kadar ciddi yan etkileri saptanmasa da istenen tedavi edici etkileri olmayan bu enantiyomerlerin yan etki oluşturabilecek gereksiz bir izomerik yükleme olduğu düşünülmektedir (Zelaszczyk ve Kononowicz 2007).



Şekil 2.3 β -adrenerjik blokerların kimyasal yapıları

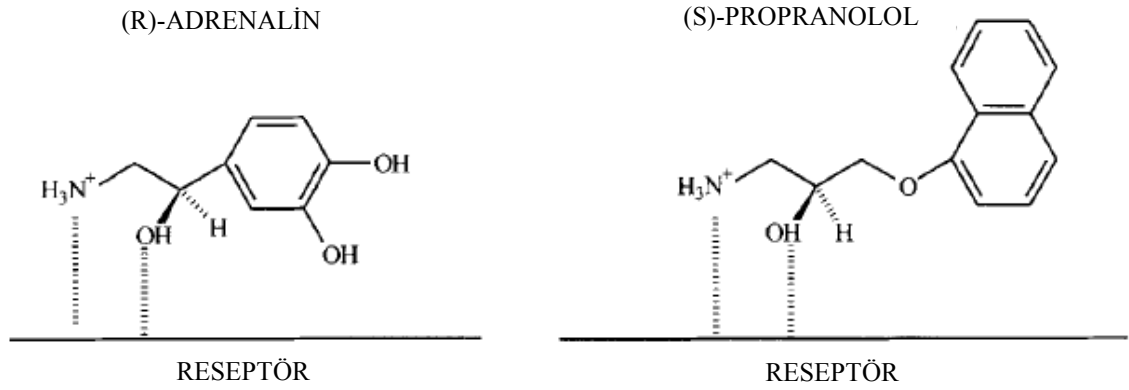
β -blokerlar, kalsiyum kanal ve angiotensin-II-blokerlara benzer işlevlere sahiptirler fakat genellikle rasemat halinde bulunurlar. β -blokerlar 1960'lı yıllarda ilk defa piyasaya sürülmüştür ve bugün birçok β -bloker Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa piyasasında bulunmaktadır. Fakat bu ilaçların sadece küçük bir bölümü tek enantiyomer halinde satılmaktadır (Agustian vd. 2010). Tek enantiyomer (S-enantiyomer) olarak satılan sadece timololdür (Ribeiro vd. 2018) Geliştirildikten 30 yıl sonra β -adrenerjik bloker aktivitesine sahip 50'den fazla farklı bileşikten yaklaşık 24 tanesi medikal uygulamalarda kullanılmak üzere ticari olarak geliştirilmiştir. Bunlardan en önemlileri propranolol, atenolol, metoprolol ve alprenololdür.

2.4 Beta Blokerlerin Temel Etki Mekanizması

Beta bloker ilaçlar, beta adrenerjik reseptörleri tersinir olarak bloke ederek etki gösterirler. Beta reseptörler, adrenalin ve noradrenalin gibi stres hormonlarınca aktive edildiklerinde, kalp hızını ve kalp atım gücünü artıran bir reaksiyonu tetikler. Beta blokerler ise beta reseptörlere bağlanarak, stres hormonlarının bu reaksiyonu tetiklemesini önlerler. Etkiledikleri organlar üzerinde sempatik sinir sisteminin ve kanda dolaşan adrenalinin sürekli etkinliği yoksa özgül etkileri meydana gelmez. Böylece beta blokerler kalbi adrenalin/noradrenalinin zararlı etkilerinden korurlar.

Beta (β) reseptörlerin iki ana tipi vardır; bunlar β_1 ve β_2 adrenerjik reseptörlerdir. Klinik tedavide kullanılan beta blokerlerin çoğu β_1 ve β_2 reseptörlere karşı aynı derecede yüksek afinite gösterirler ve bunların her ikisini de aynı derecede bloke ederler ki bunlara ‘non-selektif beta blokerler’ denir. Propranolol de bir ‘non-selektif beta bloker’dir. Buna karşılık başta bisoprolol olmak üzere atenolol, asebutilol, betaksolol, metoprolol, seliprolol ve esmolol; β_1 reseptörlere karşı β_2 ’ye göre daha yüksek afinite gösterirler. β_1 reseptörlere selektif etki gösteren ilaçlara ‘kardiyoselektif beta blokerler’ adı verilir (Kara 2014).

İlacın kardiyoselektifliği daha lipofilik olan β_2 reseptörüne göre daha hidrofilik olan β_1 reseptörü ile ilacın etkileşimine dayanmaktadır. Beta adrenerjik reseptörleri kiraldır ve adrenalin ile etkileşimi bu yolla sağlanır. Üç boyutlu yapısı nedeniyle sadece R-adrenalin reseptörlere H-bağı stereospesifik etkileşimi ile bağlanabilir, S-adrenalin bağlanamaz. Şekil 2.4’te de görüldüğü gibi adrenerjik blokerler ile reseptör etkileşimi adrenalin-reseptör etkileşimini taklit eden enantiyomer ile olmaktadır (Campo vd. 2001) ve bu enantiyomer ilaçta kardiyovasküler tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Örn. S-propranolol).

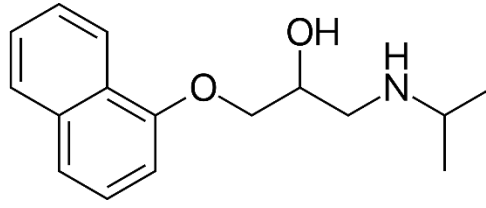


Şekil 2.4 R-adrenalin ya da adrenerjik bloker ile reseptör etkileşimi

2.5 Propranolol

Önemli β -blokerlar arasından propranololün hidroklorid tuzu (Al-Majed vd. 2017); hipertansiyon, migren ağrısı, prekardiyal rahatsızlığa bağlı göğüs ağrısı, kalp ritim bozuklukları, glökom (<http://www.oytunerbas.com.tr/farmakoloji-giris-otonom-sinir-sistemi/17/>, 2018), yüksek tansiyona sebep olan bir böbreküstü bezi vasküler tümörü tedavisi için kliniklerde kullanılmaktadır (Santoro vd. 2001, Kamal vd. 2004). Propranolol (Şekil 2.5) ayrıca hipertiroid, anksiyete bozuklukları ve çarpıntı tedavisinde de kullanılmaktadır (Al-Majed vd. 2017).

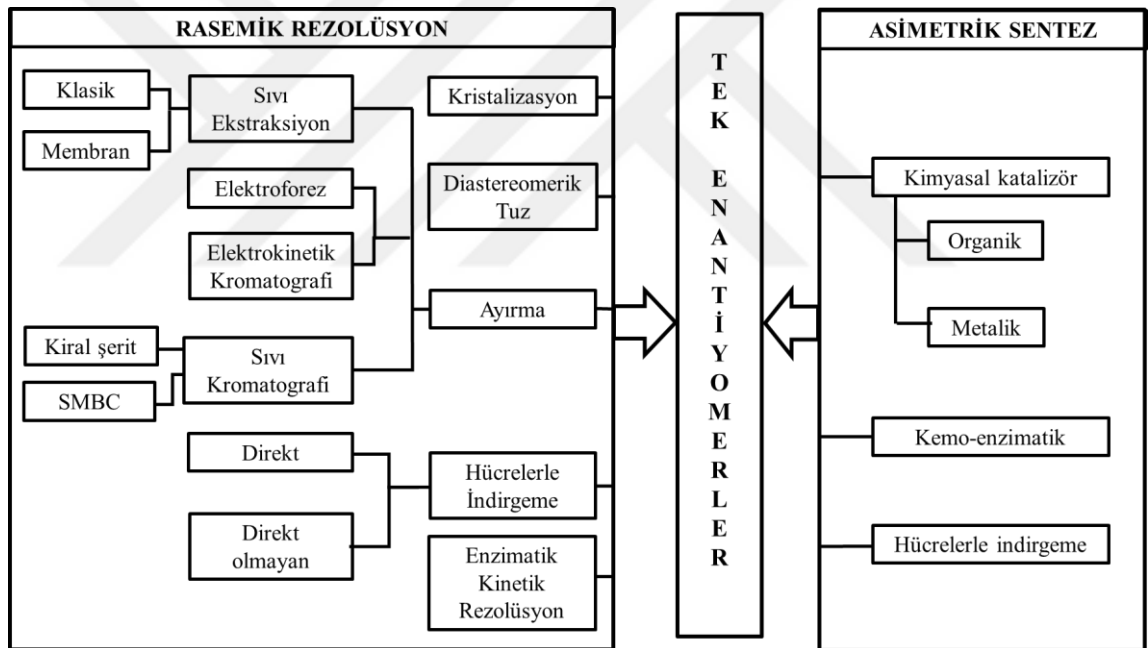
Bir sekonder amino-alkol olan propranolol (1-izopropil amino-3-(1-naftoksi)-2-propanol) ticari olarak rasemik karışım halinde satılmaktadır (Escorcia vd. 2014). Fakat rasemik halde astım hastalarında bronşların daralması ve hipertansiyon hastalarında diyabete neden olan yan etkilere sahiptir. Bu etkiler R-enantiyomerinden kaynaklanmaktadır (Barbosa vd. 2010). Fakat, R-propranolol de tiroksinin (T_4) triiyodotriyone (T_3) dönüşümünü inhibe ederek kandaki T_3 derişiminin azalmasını sağladığından hipertiroid tedavisinde (Stoschitzky vd. 1998) ve ayrıca doğum kontrol haplarında (Kong vd. 2015) kullanılmaktadır. Bu nedenle enantiyomerik saflıkta R ve S-propranololün elde edilmesi için farklı yöntemler denenmektedir.



Şekil 2.5 Propranolol molekülü

2.6 Enantiyomerik Safılıkta β -Blokler Üretim Yöntemleri

Tek enantiyomer olarak β -blokerların eldesi için genel yol şekil 2.6’da gösterilmiştir (Agustian vd. 2010).



Şekil 2.6 Tek enantiyomer olarak beta-blokerların üretimi için yol izi (Agustian vd. 2010)

Asimetrik Sentez yönteminde prokiral ya da mezo-bileşikler ile kiral bir girdi enantiyoseçimli olarak tepkimeye girer ve bu şekilde moleküle asimetriklik özelliği kazandırılmış olur. Bu yöntemde kimyasal ya da biyokatalizörler kullanılabilir (Agustian vd. 2010).

Rezolüsyon prosesleri temelde rasemik bileşikleri enantiyomerlerine ayırırlar. Prokiral ya da mezo-bileşiklere göre rasemik bileşikler daha fazla olduklarından, enantiyomerik saflıkta ürünler daha çok rasematların rezolüsyonuyla elde edilir (Schober ve Faber 2013). Bu yöntemde substrat olarak rasemik beta blokerlar, esterleri ya da diastomerik türevleri kullanılır. Her ne kadar yüksek enantiyomerik aşırılığa sahip olsalar da en fazla % 50 verim elde edilebilir (Agustian vd. 2010).

Yaygın uygulamalarına rağmen kinetik rezolüsyonun pratik uygulamalarda, özellikle de endüstriyel boyutta birçok dezavantajı vardır (Strauss vd. 1999). Bu dezavantajlar;

- Her bir enantiyomerin teorik verimi % 50’yi geçememektedir.
- Kalan substratın üründen ayrılması güç olabilmektedir. Çünkü ekstraksiyon ve distilasyonla ayıramamakta, kromatografik yöntemler gerekmektedir.
- Dönüşüm % 50 olduğunda tepkimenin sonlandırılması istenmektedir.

Yaygın olarak kullanılan kinetik rezolüsyon yönteminin sınırlamaları nedeniyle rezolüsyon tekniklerine alternatif olarak rasemattan tek bir izomerin yüksek verimle elde edildiği **derasemizasyon** yöntemi oldukça avantajlıdır. Derasemizasyon prosesleri üç mekanizmayla gerçekleşmektedir (Şekil 2.7) (Gruber vd. 2006, Schober ve Faber 2013).

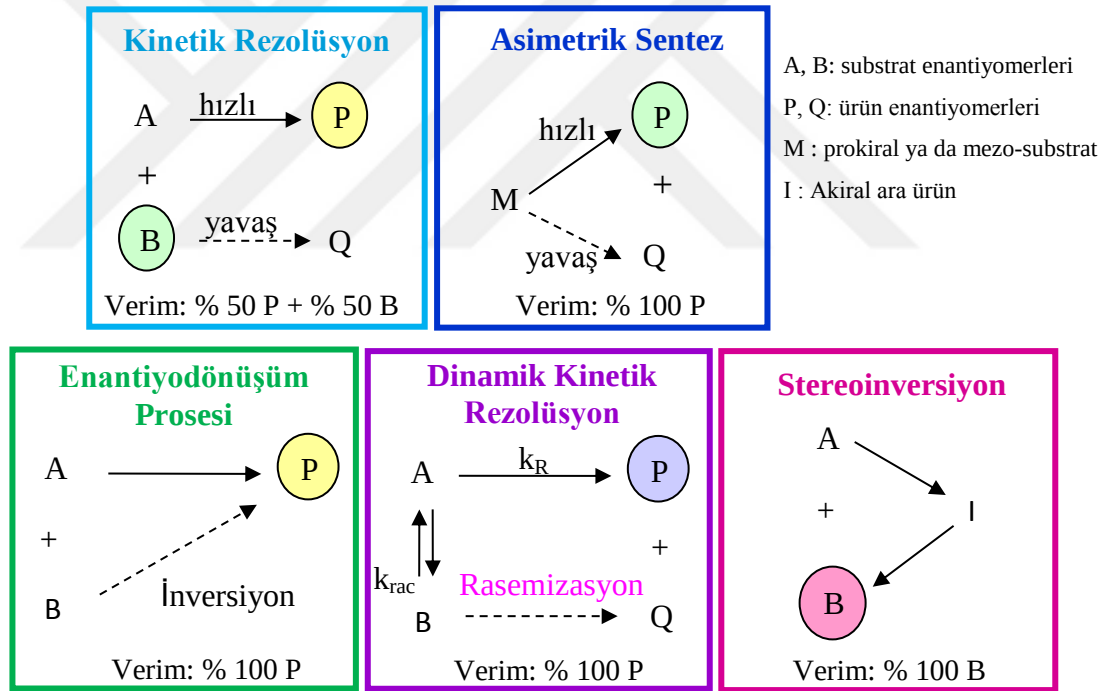
1. Enantiyodönüşüm prosesi
2. Dinamik kinetik rezolüsyon
3. Stereoinversiyon

Deresemizasyon yöntemiyle teorik verim % 100’e çıkabildiğinden bu yöntem oldukça avantajlıdır. Şekil 2.7’de kinetik rezolüsyon, asimetrik sentez ve derasemizasyon yöntemleri karşılaştırmalı olarak görülmektedir.

Enantiyodönüşüm prosesinde substratın A ve B enantiyomerlerinin ikisi de farklı yapıdaki bir ürüne farklı yollardan dönüşürler. Bir enantiyomerin konfigürasyonu sabit kalırken diğerrinin konfigürasyonu değişir (Gruber vd. 2006). Enantiyodönüşüm

prosesleri; enzimatik (tek ya da iki biyokatalizörle), kemoenzimatik ve kimyasal proseslerle gerçekleştirilmektedir (Schober ve Faber 2013).

Dinamik kinetik rezolüsyonda kinetik rezolüsyon (enzimatik) ile kimyasal ya da biyokatalitik rasemizasyon birlikte gerçekleştirilir (Oluşan ürün ortamdan ayrılmadan) (Strauss vd. 1999). Derasemizasyon proseslerinde hızlı olarak tepkimeye giren enantiyomer (A), ürünü (P) oluştururken yavaş tepkimeye giren enantiyomer (B), diğer enantiyomer bittikçe rasemizasyon tepkimesi ile A enantiyomerine dönüşmektedir. Böylece A enantiyomeri ortamda hiç bitmemekte ve ortamda bulunan iki enantiyomer de ürüne dönüşmektedir (Gruber vd. 2006). Sonuç olarak bu yöntemle ürün % 100 teorik verim ve % 100 ee ile elde edilebilir.



Şekil 2.7 Kinetik rezolüsyon, asimetrik sentez ve derasemizasyon yöntemleri (Gruber vd. 2006, Schober ve Faber 2013)

Enantiyoseçimli **stereoinversiyon** yoluyla derasemizasyonda substratın A enantiyomeri seçimli olarak akiral bir ara ürüne (I), ara ürün de B enantiyomerine dönüşerek tek ürün olarak B enantiyomeri elde edilir. Bu proses enantiyomerizasyon olarak da adlandırılabilir. Çok enzimli, kemoenzimatik ve kimyasal proseslerle gerçekleştirilebilir.

Stereoinvertiyon yöntemi enantiyodönüşüm prosesi ve DKR yöntemlerine göre daha üstündür. Çünkü burada başlangıç maddesinin (A) sadece yarısı dönüşür, diğer yarısı zaten istenen enantiyomerik ürün olarak bulunmaktadır (B). Bu nedenle bu yöntemle diğer yöntemlere göre en azından iki kat daha az reaktanta ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden bu yöntem daha ekonomiktir. Stereoinvertiyon ile derasemizasyonun olasılıklarından en ilgi çekici olanı tek aşamalı, tek basamaklı (one-pot, single-step) olarak gerçekleştirir. Tek aşamalı stereoinvertiyon yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin ard arda gerçekleşmesi ile iki basamaklı (one pot-two step) olarak da gerçekleştirilir (Gruber vd. 2006, Schober ve Faber 2013).

Stereoinvertiyonla rasemik karışımların derasemizasyonu ile kiral ilaç ara ürünlerinin biyokatalitik üretimi yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin ard arda gerçekleşmesi ile mümkün olduğundan (Matsuda vd. 2009) yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

2.7 Yükseltgenme-İndirgenme Tepkimeleri

Yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri hücresel solunum ya da fotosentez gibi temel metabolik proseslerde ve hayatın bilinen birçok formunda önemlidir. Literatürde biyokatalitik redoks tepkimeleri çokça incelenmiş ve temel olarak onların asimetric sentezdeki uygulaması vurgulanmıştır. Asimetric biyosentezde oksidaz ve redüktaz enzimleri önemli rol alırlar. Redoks biyokatalizörlerinin kullanımı farmasötik açıdan önemli moleküllerin sentetik yollarla geliştirilmesini sağlar. Bilinen enzimlerin yaklaşık % 25'i oksidoredüktazdır. Oksidoredüktazlar EC sınıflandırmasında 1 numaradır ve 22 alt sınıfı vardır. Bu enzimler stereojenik merkez oluşturabilir ya da var olanları da enantiyomerik olarak zenginleştirebilir (Hall ve Bommarius 2011).

Sekonder alkollerin yükseltgenmesinde kullanılan oksidoredüktazlar alkol dehidrojenazlar ve alkol oksidazlar olmak üzere iki katagoride sınıflanabilir (Silva vd. 2012). Oksidazlar, peroksidazlar ve oksijenazlar; yükseltgenme tepkimelerini tersinmez

olarak katalizlerler. Dehidrojenazlar (redüktazlar) ise hem yükseltgenme hem de indirgenme tepkimelerinde kullanılabilirler (Solano vd. 2012).

İndirgenme prosesleri oksidoredüktazların en sık katalizlediği tepkime tipidir. Karbonil bileşiklerin (keton, aldehit, diketon, ketoasit, ketoester) indirgenerek kiral alkol verdiği prosesler bu güne kadarki en yaygın proseslerdir. Bu bileşiklerin farmasötik ve biyoaktif moleküllerin sentezinde büyük önemi vardır. Bu yüzden ketonların stereoseçimli indirgenmesi endüstride çok ilgi çeken bir konudur (Solano vd. 2012).

Kiral yapı bloklarının üretimi için redoks enzimlerinin kullanımı sürdürülebilir ve verimli ilaç sentezi tasarımı için kimyacılar yardım eden güçlü bir araçtır. Gerçekten endüstriyel proseslerin yaklaşık % 30'u biyokatalizör yardımıyla yükseltgenme indirgenme tepkimeleriyle yürütülmektedir. Çünkü oksidoredüktazların kullanımı kimyasal redoks katalizörleriyle karşılaştırıldığında çevresel açıdan çok caziptir (Solano vd. 2012).

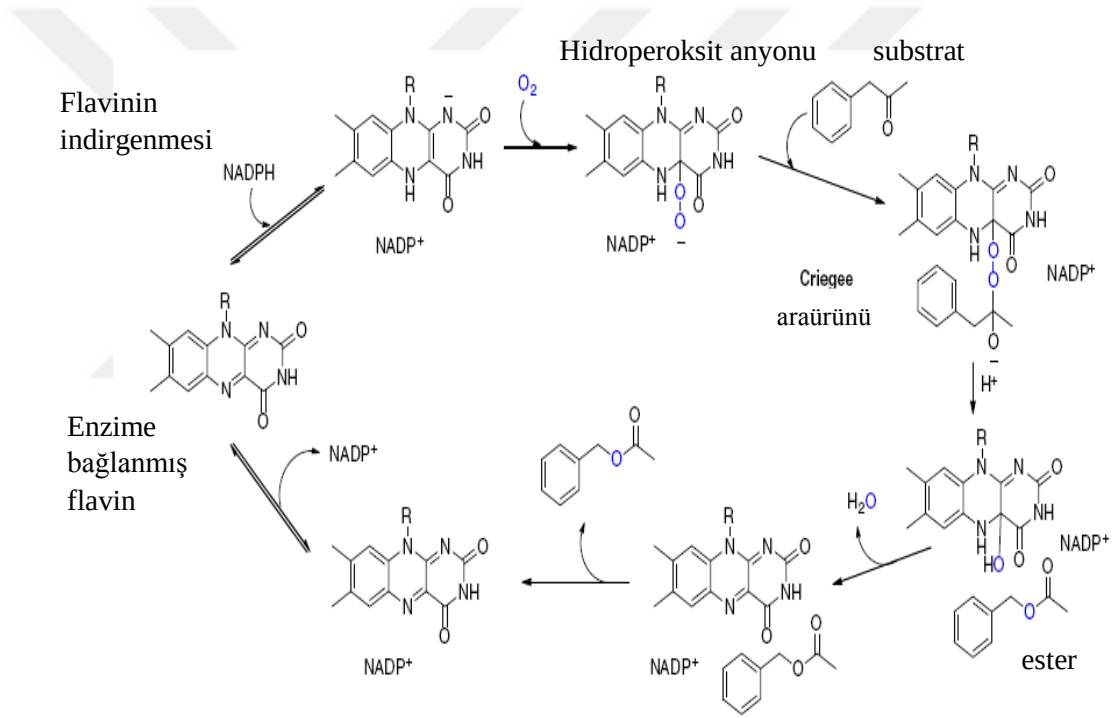
Oksidoredüktazlar tarafından katalizlenen tepkimeler genellikle tüm hücre kullanılarak gerçekleştirilir (Solano vd. 2012). Fakat, dehidrojenazlar ve diğer kofaktör gerektiren oksidoredüktazların büyük ölçek uygulamaları nikotinamid kofaktörü gerektirmeleri ve bu kofaktörlerin yüksek maliyetine bağlı olarak genellikle zordur. Bu yüzden etkili bir rejenerasyon yöntemi istenir (Rehn vd. 2016).

2.7.1 Reaksiyon mekanizması

Bazı enzimler aktivite gösterebilmek için, kofaktör olarak adlandırılan, protein olmayan moleküllere ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler, inorganik (metal iyonları, demir-kükürt kümeleri vb.) veya organik bileşiklerdir (flavin vb.). Organik kofaktörler ya prostetik gruptur, bunlar enzime sıkıca bağlıdır ya da koenzimdir, bunlar tepkime sırasında enzimin aktif merkezinden salınırlar. Koenzimler arasında NADH, NADPH ve ATP sayılabilir. Bu moleküller enzimler arasında kimyasal gruplar taşımaya yararlar (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim>, 2016).

2.7.1.2 Flavin bağılı enzim için mekanizma

Flavin bir kofaktördür ve ikinci kofaktör olarak NADPH'ı gerektirmektedir. Şekil 2.9'da görüldüğü gibi ilk basamakta enzime bağlanmış flavinin NADPH ile indirgenmesi gerçekleşmektedir. Daha sonra indirgenmiş flavine oksijen eklenerek hidroperoksit anyonu oluşmakta ve substrat olan ketonla tepkimeye girerek Criegee araürünü oluşturmaktadır. Son olarak ester oluşmakta, sonra sırasıyla su, ürün ve NADP^+ enzimden ayrılmaktadır. Sonuçta bu mekanizmanın gerçekleşmesi için moleküler oksijen ve NADPH gereklidir (Matsuda vd. 2009).

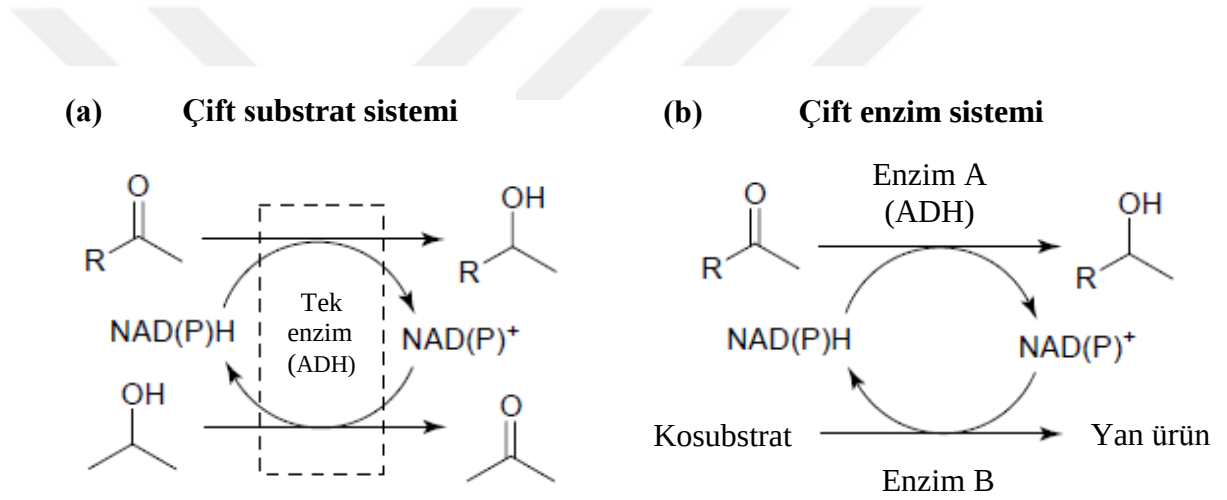


Şekil 2.9 Flavin bağılı enzim için mekanizma

Enzimlerin aktivite göstermek için ihtiyaç duydukları kofaktörlerin yüksek maliyeti, etkili kofaktör rejenerasyonunu gerekli kılmaktadır (Ni ve Xu 2012).

2.7.2 Kofaktör rejenerasyonu

Bir ketonun alkole dönüşümü ya da alkolün ketona yükseltgenmesi organik kimyada en genel redoks tepkimeleridir. Bu dönüşümlerde biyotransformasyonların kimyasal yöntemlere göre önemli avantajları vardır. Ketonun indirgenmesi ve alkolün yükseltgenmesinde büyük çoğunlukla dehidrojenazlar ve redüktazlar kullanılmaktadır. Ve bu enzimler NADH ve NADPH gibi nikotinamid kofaktörleri ister (Kroutil vd. 2004). Nikotinamid kofaktörleri pahalı olduğundan ekonomik olarak uygulanabilir biyokatalitik prosesler için kofaktörlerin rejenerasyonu gereklidir (Petschacher vd. 2014). Etkili rejenerasyon için iki strateji uygulanabilir (Şekil 2.10) (Kroutil vd. 2004).



Şekil 2.10 Kofaktör rejenerasyonu için yöntemler (a) çift substrat sistemi (b) çift enzim sistemi

Çift substrat sistemi: En basit ve iyi yaklaşım tek enzim kullanarak, substrat ve kosubstratın eş anlı dönüşümüdür (Şekil 2.10-(a)). (Daha sonra, dengeyi istenen yöne kaydırmak için, aşırı miktarda eklenebilir. Bu sistem yaygın olarak kosubstrat inhibisyonu ile engellenmektedir. Etkili ön koşul, büyük skalada çift substrat sisteminde kimyasal olarak kararlı bir dehidrojenaz kullanılmasıdır).

Çift enzim sistemi: Çift substrat sistemindeki sakıncaları önlemek için kofaktör rejenerasyonu ikinci bir enzim kullanılarak enzimatik tepkimeyle (tercihen tersinmez tepkime ile) yapılabilir (Şekil 2.10-(b)). Bu, daha karmaşık bir yaklaşımdır. En ileri rejenerasyon sistemi yükseltgen ya da indirgen olarak sırasıyla zararsız oksijen ve

hidrojen kullanımıdır (Kroutil vd. 2004). Bu sistem için ek bir enzim daha kullanılması tepkime maliyetini artırır (Yan vd. 2011).

Kofaktör rejenerasyon sisteminin başarısı şu koşullara bağlıdır: Termodinamik ve kinetik açıdan uygun olmalı, sistem sentetik tepkime için koşullarla uyumlu olmalı, gerekli maddeler ve cihazlar düşük maliyetli olmalı, ürün izolasyonu kolay olmalı (Rehn vd. 2016).

İndirgenmiş kofaktörün rejenerasyonunun tersine yükseltgenmiş kofaktörün (NAD(P)^+) rejenerasyonu için yöntemler yakın zamana kadar fazla gelişmemiştir ve yükseltgenmiş kofaktörün rejenerasyonunu gerçekleştirebilen birkaç enzim vardır. Bu yüzden her ne kadar farklı rejenerasyon yöntemleri denenmiş olsa da NAD(P)^+ gerektiren dehidrojenazların yükseltgenme tepkimelerinde kullanımı ilgi çekici olarak kalmıştır.

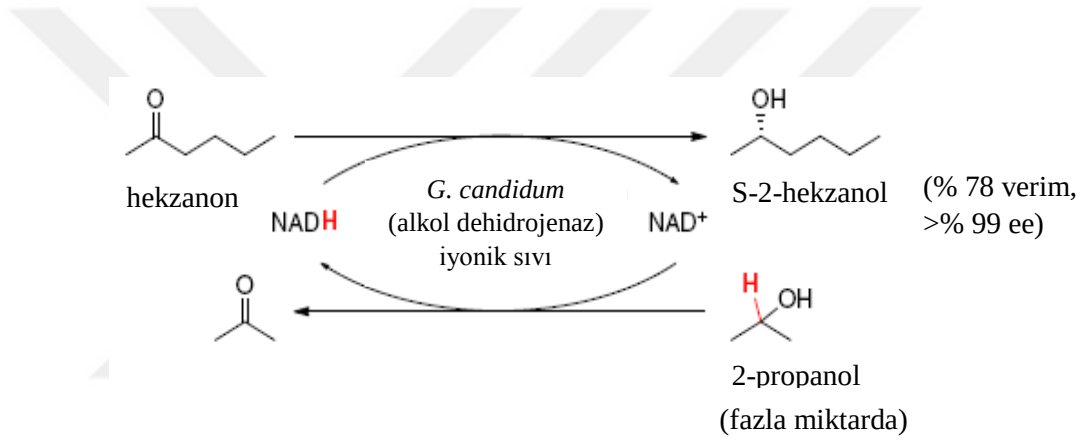
Enzimatik yöntemler etkili rejenerasyonu gerekli olan kofaktör için yüksek seçicilik avantajına sahip olsa da (Rehn vd. 2016) halihazırda, kofaktör sorununu önlemek için birçok olasılık vardır. Bunlar; tüm hücre kullanımı, enzimatik, elektrokimyasal, fotokimyasal ya da kimyasal yaklaşımlardır (Ni ve Xu 2012). Kofaktör rejenerasyonu için hidrojen ve oksijen kaynağı olarak kullanılan yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

2.7.2.1 Kofaktör rejenerasyonu için hidrojen kaynağı

Karbonil gruplarının indirgenmesini katalizleyen enzimler bir hidrojen iyonunu karbonil karbonuna transfer eden koenzim isterler. Koenzimler çok pahalı olduğundan oksitlenmiş formları tepkimenin bir diğer döngüsünde kullanılmak için indirgenmelidir. Bu indirgenme tepkimesi için hidrojen kaynağı gereklidir. Etanol, 2-propanol gibi alkoller, glukoz, glukoz-6-sülfat gibi şekerler, formik asit, glutamik asit gibi amino asitler, ve moleküler hidrojen bu amaçla kullanılabilir. Elektrik ve ışık gücü gibi güç kaynakları da kullanılabilir (Matsuda vd. 2009).

2.7.2.1.1 Alkoller

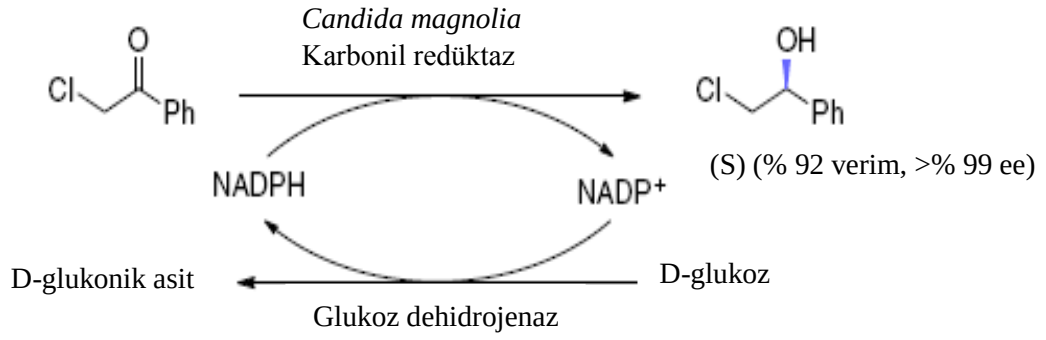
Alkol dehidrojenaz enzimi tarafından katalizlenen indirgenme reaksiyonunda kullanılan koenzimin rejenere edilmesi için etanol ve 2-propanol gibi alkoller yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle dengeyi ürün olan alkollerin oluşumuna doğru kaydırmak için hidrojen kaynağı ortama aşırı miktarda eklenir. Örneğin, hekzanonun S-2-hekzanole iyonik sıvı içerisinde NAD^+ varlığında alkol dehidrojenaz katalizli (*Geotrichum candidum*) indirgenmesinde koenzimin indirgenmiş formunun rejenerasyonu için hidrojen kaynağı olarak 2-propanol kullanılmış, S-2-hekzanol % 78 verim ve > % 99 ee elde edilmiştir (Şekil 2.11) (Matsuda vd. 2009).



Şekil 2.11 Kofaktör rejenerasyonu için alkol kullanılması

2.7.2.1.2 Şekerler

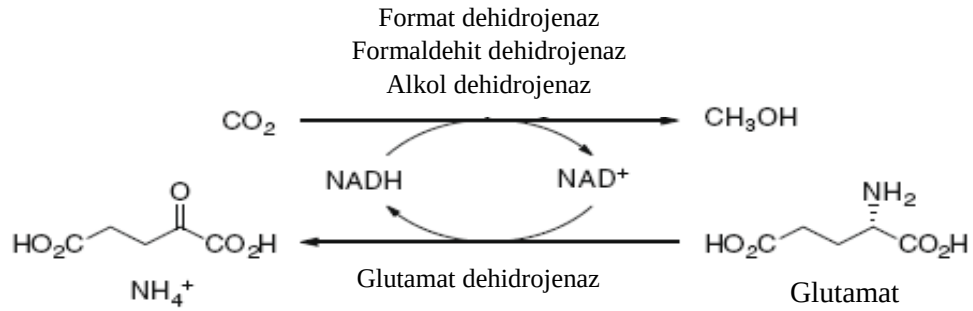
Koenzim rejenerasyonu için glukoz, glukoz-6-fosfat yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin *Candida magnolia* kaynaklı redüktaz katalizli olarak ketonların indirgenmesinde koenzimin rejenerasyonu için glukoz ve glukoz dehidrojenaz kullanılmıştır (Şekil 2.12) (Matsuda vd. 2009).



Şekil 2.12 Kofaktör rejenerasyonu için şeker kullanılması

2.7.2.1.3 Amino asit

NADH'nin rejenerasyonu için glutamat dehidrojenaz yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin karbondioksitin metanole çok enzimli sistem ile formik asit ve formaldehit kullanılarak indirgenmesinde kofaktörün oksitlenmiş formu (NAD^+) glutamat dehidrojenaz ve glutamik asit ile indirgenmektedir (Şekil 2.13) (Matsuda vd. 2009).

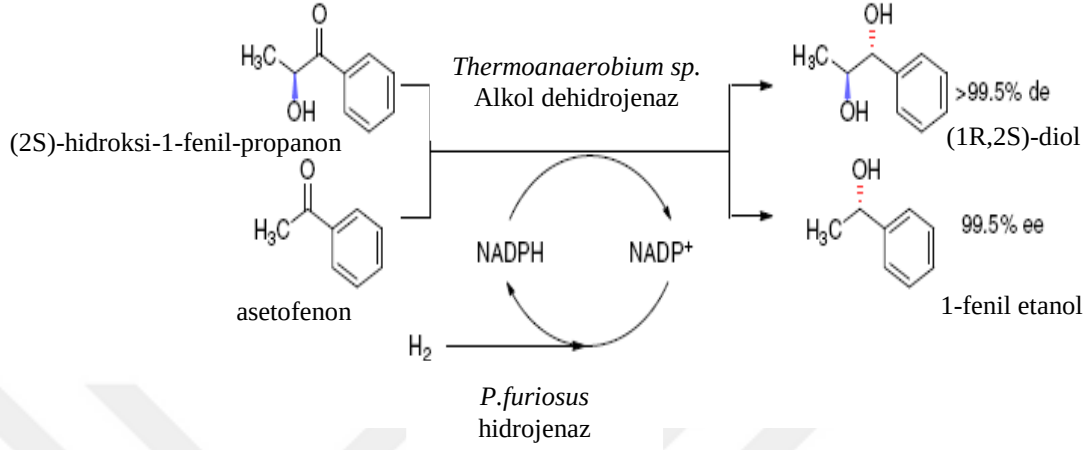


Şekil 2.13 Kofaktör rejenerasyonu için aminoasit kullanılması

2.7.2.1.4 Hidrojen

Koenzimin rejenerasyonu için moleküler hidrojen de kullanılmaktadır. Hipertermofilik bir tür olan *P. furiosus*'tan elde edilen hidrojenaz ile moleküler hidrojen NADPH'nin rejenerasyonunda kullanılmaktadır. Termofilik *Thermoanaerobium* sp. kaynaklı NADPH-bağımlı alkol dehidrojenaz katalizli olarak (2S)-hidroksi-1-fenil-propanon

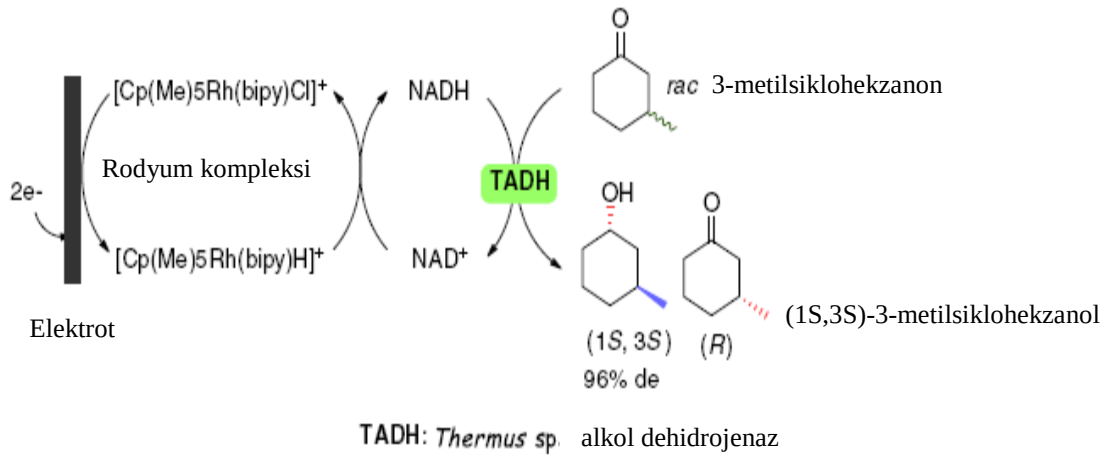
(1R,2S)-diol > % 99.5 de ile dönüşmektedir. Benzer olarak aynı indirgenme sistemi kullanılarak asetofenon da indirgenmektedir (Şekil 2.14) (Matsuda vd. 2009).



Şekil 2.14 Kofaktör rejenerasyonu için hidrojen kullanılması

2.7.2.1.5 Elektrokimyasal rejenerasyon

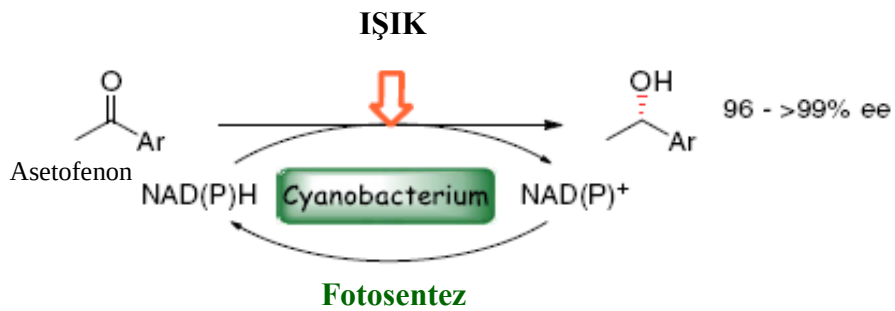
Kofaktörlerin elektrokimyasal rejenerasyonu 1980'lerden beri temiz ve sürdürülebilir bir teknoloji olarak umut vaat etmektedir. Fakat enzimatik reaksiyonlarla bu teknolojinin birleşmesi düşük üretim, yetersiz kararlılık ve ölçek büyütme zorluğu nedeni ile genellikle uygulanamamaktadır. Şekil 2.15'de NADH'nin rejenerasyonu için rodyum kompleksinin kullanılması görülmektedir. Burada ürün inhibisyonunu engellemek için ikinci bir organik faz olarak oktan kullanılmıştır. Böylece 3-metil sikloheksanonun *Thermus* sp. kaynaklı termofilik alkol dehidrojenaz katalizli olarak indirgenmesi ile (1S,3S)-3-metil siklo heksanol % 96 de ile elde edilmiştir (Matsuda vd. 2009).



Şekil 2.15 Kofaktör rejenerasyonu için elektrokimyasal yöntem

2.7.2.1.6 Işık enerjisi ile rejenerasyon

NAD(P)H ya da flavini rejenere etmek için ışık enerjisinin kullanıldığı fotokimyasal yöntemler çevre dostu sistemlerdir. Örneğin şekil 2.16'da fotosentetik bir mikroorganizma olan *Cyanobacterium* kullanılarak asetofenon türevlerinin indirgenmesi karanlığa göre aydınlıkta daha etkili bir şekilde gerçekleştirilmiştir. *Cyanobacterium* ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürmekte, elektron transferi ile NADPH oluşumunu sağlamaktadır. Böylece kiral alkol 96-%>99 ee ile elde edilmiştir. Işık enerjisi doğada CO_2 'nin indirgenerek organik bileşiklerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Benzer şekilde indirgenmiş flavin de ışık enerjisi ile rejenere edilebilmektedir (Matsuda vd. 2009).



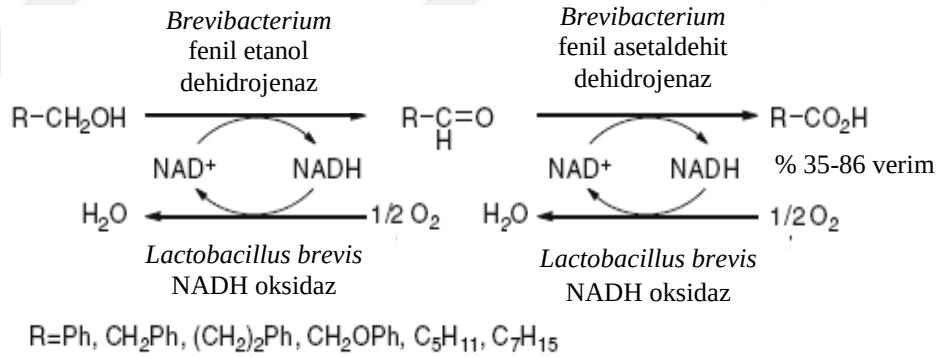
Şekil 2.16 Kofaktör rejenerasyonu için ışık enerjisinin kullanılması

2.7.2.2 Kofaktör rejenerasyonu için oksijen kaynağı

Yükseltgenme tepkimelerinde koenzimin indirgenmiş halinin rejenere edilmesi gereklidir. Bunun için moleküler oksijen ve elektrik gücü kullanılabilir (Matsuda vd. 2009).

2.7.2.2.1 Moleküler oksijen

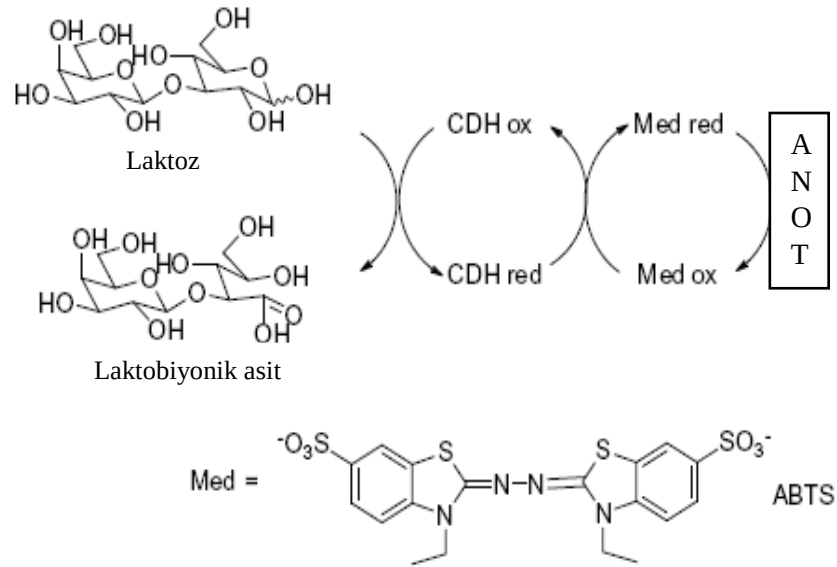
Lactobacillus brevis kaynaklı NADH oksidaz ılımlı koşullarda alkollerin yükseltgenmesi için moleküler oksijen kullanılarak NADH'nin yükseltgenmesinde kullanılan bir enzimdir. Bu sistem primer alkollerin *Brevibacterium* alkol dehidrojenaz ve aldehit dehidrojenaz katalizli asitlere oksitlenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2.17) (Matsuda vd. 2009).



Şekil 2.17 Kofaktör rejenerasyonu için oksijen kullanılması

2.7.2.2.2 Elektrokimyasal

Koenzimin oksitlenmiş formu elektrik gücü kullanılarak rejenere edilebilir. Laktoz sellobiyoz dehidrojenaz (CDH) katalizli olarak laktobionik asite yükseltgenmekte, aracı olarak kullanılan ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) anotta yükseltgenmekte, yükseltgenen aracı enzimi yükseltgemekte, substratın yükseltgenmesi de bunu izlemektedir (Şekil 2.18) (Matsuda vd. 2009).



CDH:Flavin bağı sellobiyoz dehidrojenaz

Şekil 2.18 Kofaktör rejenerasyonu için elektrokimyasal yöntem

Kofaktör rejenerasyonu için oksidoredüktazların kullanımı yaygın bir durumdur. Etkili rejenerasyon yöntemleri çeşitli redoks proseslerine uygulanmaktadır (Hall ve Bommarius 2011).

2.7.3 ADH

Alkol dehidrojenazlar (EC 1.1.1.1) en çok araştırılan redoks enzimlerindendir ve artık birçok endüstriyel proseste kullanılmaktadır (Hall ve Bommarius 2011). Karbonil redüktaz (CR) olarak da anılan alkol dehidrojenazlar (ADH) nikotinamid gerektiren oksidoredüktazların bir sınıfıdır. Substratı iyi tanıma özelliklerine bağlı olarak yüksek enantiyomerik aşırılıkla ürün üretirler. Kolay elde edilebilmeleri ve yüksek derecede stereoseçimlikleri nedeniyle ADH/CR özellikle kimyasal ve farmasötik endüstrisinde çok önemli yapı blokları olan kiral alkollerin sentezinde ilk tercih olmaktadır (Yan vd. 2011, Simon vd. 2013).

ADH'lar enantiyoseçimli alkol yükseltgenmesi ve keton indirgenmesinde en yaygın kullanılan enzimdir. Bu enzimler NAD^+ ya da NADP^+ gerektirirler ve sekonder

alkollerin ketona, primer alkollerin aldehite yükseltgenmesini katalizlerler. ADH enzimleri tüm yaşayan organizmalarda bulunurlar. Mikrobiyal hücreler birçok dehidrojenaz ve bir de yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri için uygun kofaktörü de içerebilirler. Bu yüzden kofaktör rejenerasyonu hücre tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir. Ayrıca enzim ve kofaktörler hücre içinde iyi korunur (Silva vd. 2012).

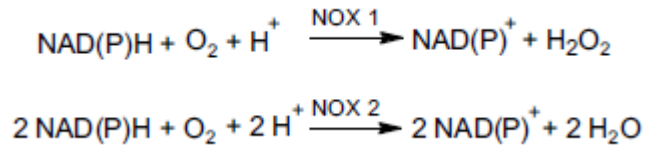
ADH'lar akademi ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Simon vd. 2013). Ketonların asimetrik biyokatalitik indirgenmesi ile optikçe saf alkollerin üretimi asimetrik sentezde gelişmiş bir yöntemdir ve özellikle farmasötiklerde kullanılan ara ürünler olan kiral alkollerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu indirgenme tepkimeleri ADH'lar tarafından katalizlenmektedir. İndirgenme için istenen hidrid, nikotinamid kofaktörü olan NADH ve NADPH'tan sağlanmaktadır. Bu kofaktörler sadece katalitik miktarda gereklidir ve tepkime sırasında rejenere edilmesi gerekmektedir. Bu rejenerasyon hidrojen kaynağı olarak ucuz bir alkol, glikoz ya da format kullanılarak hidrojen transferi gerçekleştirilerek yapılır. Fakat glikoz ve format kullanıldığında ek bir enzim gerekir (glikoz dehidrojenaz ve format dehidrojenaz). Kofaktör rejenerasyonu prosesin ekonomik olarak uygulanabilirliği için kritik bir noktadır (Rajagopalan ve Kroutil 2011). Alkol dehidrojenazlar her ne kadar öncelikle prokiral bileşiklerin indirgenmesinde kullanılsa da kimyasal olarak sentezlenmesi zor olan keto bileşiklerinin üretiminde ve kiral alkollerin rezolüsyonunda çok kullanılır (Rajagopalan ve Kroutil 2011).

2.7.4 NADH oksidaz

NAD(P)H oksidaz (NOX (EC 1.6.3.X)) substrat olarak moleküler oksijen kullanabilen ve ürün olarak su ya da hidrojen peroksit oluşturarak kofaktör rejenerasyonunu sağladığından önem verilen bir enzim sınıfıdır. Bu enzimlerin kullanımına son zamanlarda ilgi artmıştır (Rehn vd. 2016).

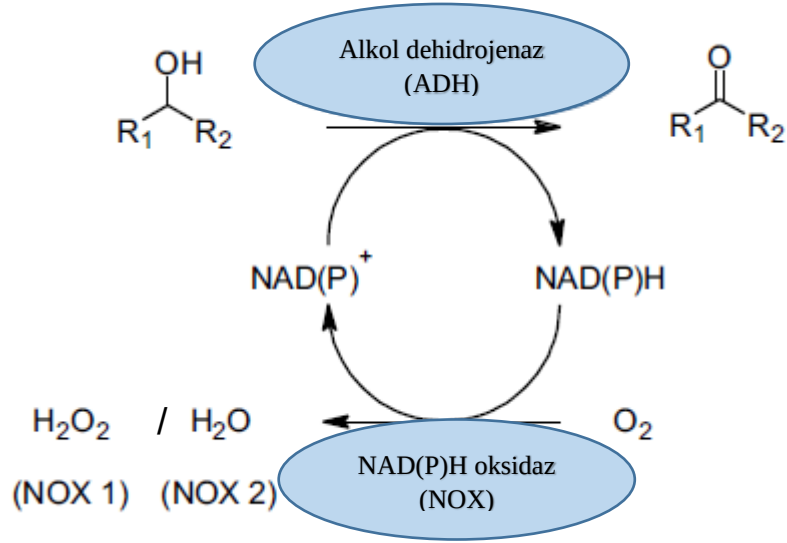
NAD(P)H oksidaza dayanan rejenerasyon sistemi, diğer enzimatik tekniklerin üzerinde birçok avantaja sahip olduğundan ilgi çekici bir sistemdir. Öncelikle, moleküler oksijen

ucuz, zararsız ve bol bir substrattır (Kroutil vd. 2004, Rehn vd. 2016). Bu nedenle, kosubstrat eklenmesine gerek olmamaktadır (Petschacher vd. 2014). İkincisi, tepkime karışımında birkaç organik bileşik olmasından dolayı tepkime gibi sonraki proses de (ürünün saflaştırılması) önemli ölçüde basittir. Fakat bazı durumlarda ürün özellikleri kosubstrattan ve yan üründen dolayı önemli ölçüde farkedebilir. Bununla beraber NOX-temelli rejenerasyon sistemi diğer rejenerasyon yöntemleri ile (en az stokiyometrik miktarda organik kosubstrat isteyen yöntemler) karşılaştırılınca üretilen ürünün gramı başına daha az organik atık ürettiğinden genel bir avantaja sahiptir. İlginç bir şekilde NOX-enzimleri daha pahalı olan fosforile kofaktörleri yükseltgeyebilmektedir. NOX enzimleri FAD (flavin adenin dinükleotid) gerektiren oksidazlardır ve yan ürün olarak hidrojen peroksit (NOX1) ya da su (NOX2) üretirler (Rehn vd. 2016) (Şekil 2.19). Ayrıca, oksijenin yüksek redoks potansiyeli nedeni ile yüksek termodinamik yürütücü güç oluşmaktadır (Petschacher vd. 2014).



Şekil 2.19 NOX enzimleri ile yükseltgenme tepkimeleri

ADH/NOX çiftinin kullanıldığı bir sistemin basitleştirilmiş gösterimi şekil 2.20’de verilmiştir (Rehn vd. 2016).



Şekil 2.20 ADH/NOX çiftinin kullanıldığı bir sistem

2.7.5 Yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinde mikrobiyal tüm hücre kullanılması

Bazı durumlarda biyokatalizör olarak izole enzimlerden çok mikrobiyal tüm hücre kullanılması daha akıllıcadır. Bu, çoğunlukla redoks biyotransformasyonu için kofaktör rejenerasyonunun zorunlu olduğu ve/veya enzimin hücre dışında kararsız olduğu durumlarda geçerlidir. Bu yüzden oksidoredüktazlar çoğunlukla tüm hücre olarak kullanılır, çünkü bu durumda kofaktör rejenerasyonundan hücre içi metabolizması sorumludur. Tüm hücreler çok basamaklı tepkime planlandığı zaman kullanılır, çünkü hücre içinde çok enzim bulunmaktadır ve böylece hücre içi kofaktör rejenerasyonu gerçekleşebilir. Fakat tüm hücre kullanarak biyodönüşüm gerçekleştirmenin bazı sakıncaları vardır:

- 1) Enzim aktivitesi düşüktür, proses verimi düşüktür ve final ürünün saflaştırma prosesi zordur. Bu yüzden 'Environmental Factor' E değeri çok yüksek olma eğilimindedir.
- 2) Substrat ya da ürünün sınırlı geçirgenliği
- 3) Substrat ya da ürünün hücre üremesine inhibisyonu
- 4) Hücre metabolizması tarafından substrat ya da ürünün degradasyonu (Solano vd. 2012).

Ucuz bir rasemik substrattan ya da ‘atık’ enantiyomerden enantiyomerik saflıkta değerli ürünleri tek bir tepkime kabında birçok katalizörle % 100 verim ve % 100 ee ile elde etmek önemli bir konudur. Doğada bir mikroorganizmanın içinde birçok biyokatalizör vardır. Fakat substrat olarak doğal olmayan bileşikler kullanıldığında istenen çok basamaklı kimyasal sentez için uygun aktif ve seçici enzimler genellikle bir mikroorganizmanın içinde olmaz. Alternatif olarak her bir tepkime basamağı için en iyi enzim farklı mikroorganizmalardan seçilebilir ve etkili ardışık (tandem) dönüşüm için istenen oranlarda ayarlanır. Bu durumda belki de en önemli şey farklı katalitik tepkimelerin birbirini engellememesidir. İzole enzimlerle karşılaştırıldığında biyotransformasyonda biyokatalizör olarak tüm hücre kullanılmasının birçok avantajı vardır: Enzimler hücre içinde doğal ortamında olduğunda daha kararlıdır ve pahalı kofaktör (NADH/NADPH) rejenerasyonu ve enzimin yorucu ayrılma işlemleri olmadığından maliyeti çok düşüktür (Li vd. 2010).

2.7.6 Ardışık tepkimeler

İki ya da daha fazla dönüşümün olduğu herhangi bir tepkime sistemi eş anlı olarak aynı tepkime kabında ve en az bir biyokatalizörle gerçekleştiğinde biyokatalitik ardışık tepkimeler (cascade, tandem, domino) olarak adlandırılır. Bu sistem çok enzimli, kemo-enzimatik ve enzimle başlayıp kendiliğinden devam eden seriler olabilir (Ricca vd. 2011). Çok enzim kullanılarak gerçekleştirilen biyokatalitik ardışık tepkimeler, substrat ve ürün inhibisyonundan kaçınmak ve enzimatik tepkimelerde dengeyi tepkime yönüne kaydırmak için ilginç ve etkili yaklaşımlardır (Satyawali vd. 2017).

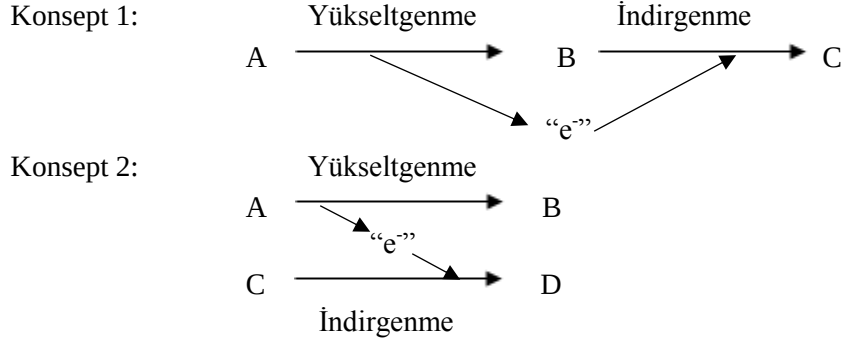
Tepkime serisinin aynı tepkime kabında ardışık ya da eş anlı gerçekleşmesi ile zaman kaybı, verimi azaltan ara ürün ayırma, saflaştırma işlemleri önlenir. Sonuçta ara ürünün ekstraksiyonu (saflaştırılması) için gereken kimyasal, çözücü miktarı azaldığından maliyet açısından ve çevresel açıdan avantajlıdır.

Bir ardışık tepkime prosesi ile yükseltgenme ve indirgenmenin birlikte gerçekleşmesi dönüşümün çok ekonomik ve etkili olmasını sağlar. Tek bir tepkime kabında

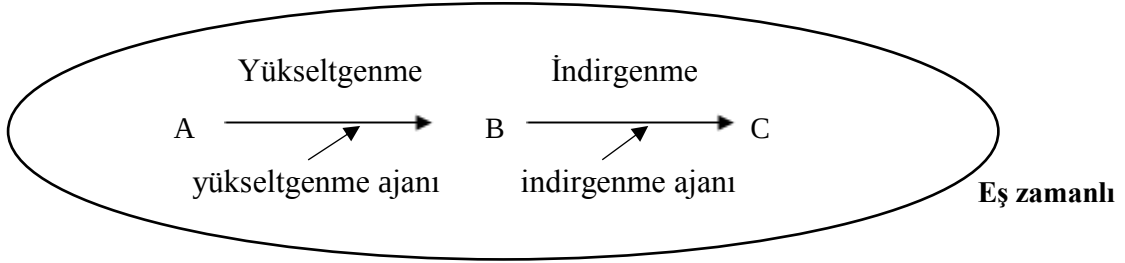
yükseltgeme-indirgenme tepkimelerinde, iki tepkime aynı anda ya da ara ürün ayrılmadan ardışık olarak gerçekleşmektedir. Yükseltgenme ve indirgenme prosesleri canlı hücrelerle aynı anda gerçekleştiğinden, enzimler sentetik redoks ardışık tepkime uygulamalarını araştırmak için belki de mükemmel katalizörlerdir (Schrittwieser vd. 2011).

Yükseltgenme-indirgenme ardışık tepkimelerini gerçekleştirmek için en basit yaklaşım; ilk redoks tepkimesinin tamamlanması, sonra istenen reaktiflerin eklenerek ikinci basamağın başlatılmasıdır. Böylece tepkime basamakları ayrı ayrı fakat aynı tepkime kabında gerçekleşmektedir. İki redoks tepkimesinin aynı anda, aynı tepkime kabında, eş anlı olarak gerçekleşmesi daha ilginçtir. Bu durumda yükseltgenme ve indirgenme birbirine bağlanır. Burada istenen, yükseltgenme basamağında kazanılan elektronun indirgenme basamağında kullanılmasıdır. Böylece yükseltgenme için ek reaktif eklenmesine gerek olmamaktadır. Yükseltgenme-indirgenme ardışık tepkimelerinin gerçekleşme mekanizmaları şu şekildedir: (1a): Eş anlı redoks nötral yükseltgeme-indirgenme ardışık tepkimeleri, (1b): Tek bir tepkime kabında eş anlı bağımsız redoks ardışık tepkimeleri, (2): Tek bir tepkime kabında fakat ayrı zamanlarda birbirini takip eden yükseltgenme-indirgenme ardışık tepkimeleri (Şekil 2.21)

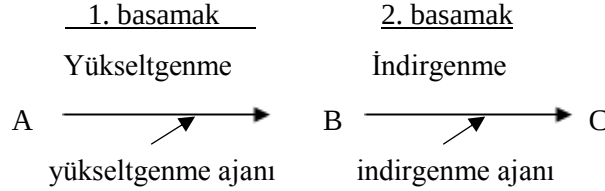
1. Tek bir tepkime kabında eş anlı yükseltgenme indirgenme tepkimeleri
(a) Birbirine bağlı yükseltgenme-indirgenme, redoks nötral ardışık tepkimeleri



- (b)** Bağımsız redoks basamaklarını içeren ardışık tepkimeler



2. Tek bir tepkime kabında, ayrı zamanlarda yükseltgenme-indirgenme ardışık tepkimeleri



Şekil 2.21 Yükseltgenme-indirgenme ardışık tepkimelerinin gerçekleşme mekanizmaları

(1a) → Sistemik nedenlerle bu yaklaşım iki konseptte ayrılmaktadır. Birinci konseptte substrat bir ara ürüne dönüşmekte, sonra tekrar tepkimeye girmektedir. Bu klasik ardışık tepkime görünümüdür. İkincisinde iki paralel tepkime redoks eşdeğerinin transferiyle birbirine bağlanmaktadır. Bu konsept klasik kofaktör rejenerasyon yöntemine uymaktadır. Bu konsept kullanılarak iki substrat enantiyomerinin tek bir ürün enantiyomerine dönüştüğü derasemizasyon gerçekleştirilebilir (Schrittweiser vd. 2011). ADH enzimi kullanılarak sekonder alkollerin rasemizasyonu konsept 1’e örnek olabilir.

Alkol enantiyomerinin biri ketona yükseltgenir. Sonra da ters stereoseçimlilikteki bir ADH ile diğer enantiyomere indirgenir. Elektronlar NAD(P)H yoluyla gidip gelir.

(1b): Her ne kadar konsept 1'deki redoks nötral ardışık tepkimelerin gerçekleşmesi istense de kinetik ve termodinamiğinin uygun olması gerektiğinden bu konseptin etkili bir şekilde kurulması zordur. '1b'ye göre iki bağımsız redoks basamağının, kinetiği ve redoks dengesi kolaylıkla kontrol edilebilir. Bu durum en çok sekonder alkollerin, α -aminoasitlerin ya da α -kiral aminlerin derasemizasyonunda kullanılabilir (Schrittweiser vd. 2011). Bu yöntem sadece enzimlerle ya da bir kimyasal basamakla gerçekleştirilebilir. Sekonder alkollerin derasemizasyonu stereoseçimlilik açısından birbirini tamamlayan iki ADH (ters kofaktör tercihinine sahip) tarafından gerçekleştirilir. Bu sistemde yükseltgenmiş NADP⁺ NADPH oksidaz tarafından etkili bir şekilde rejenere edilirken indirgenmiş NADH kofaktörü ile başka bir rejenerasyon gerçekleşir. Burada bir enantiyomerin optikçe saf formunu elde etmek için dört enzim kullanılabilir.

(2): Yükseltgenme indirgenme basamakları için karakterize edilen farklı tepkime koşulları prosesin tek bir tepkime kabında eş anlı gerçekleştirilmesini engelleyebilir. Örneğin yükseltgenme basamağı için gereken oksijen indirgenme basamağındaki enzimi inaktive edebilir. Bu durumda yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri aynı tepkime kabında ayrı olarak gerçekleştirilir (Schrittweiser vd. 2011).

Ardışık tepkimelerin genellikle çok enzimli sistem ya da biyo ve kemo-katalizör kombinasyonu ile gerçekleştirilmeleri ilgi çekici sentetik stratejilerdir (Ni ve Xu 2012).

2.8 Deneysel Tasarım

Deney, kontrol altındaki çeşitli durumların/koşulların, deney birimlerinin bilinmeyen karakteristik özellikleri üzerindeki etkisini test etmek amacıyla uygulanan bir işlem veya süreç olarak tanımlanabilir (Şenoğlu ve Acıtaş 2010). Mühendislikte, ürün ve süreç geliştirmede deneysel çalışmalar önemli bir rol oynar (Gökçe ve Taşgetiren 2009).

Deney tasarımı ise deney birimlerinin maruz kalacağı kontrol altındaki durumların veya koşulların düzenlenmesi ile ilgilidir. Bu durum veya koşulların düzenlenmesi belli ilkeler ve kurallar çerçevesinde geliştirilen tasarımlar yardımıyla yapılır.

Deney birimlerinden elde edilen gözlem değerlerine, oldukça popüler bir teknik olan Varyans Analizi (**AN**alysis **Of** **VA**riance-ANOVA) uygulanarak araştırma konusu olan faktör veya faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı belirlenmeye çalışılır (Şenoğlu ve Acıtaş 2010).

İstatistiksel deney tasarımının amacı minimum zaman, kaynak ve harcama ile maksimum anlamlı verileri toplamaktır. Bundan dolayı deney tasarımı geleneksel yöntemlerden uzak ve araştırmalara yeni bir yaklaşım getirir. Geleneksel deney tasarım yöntemleri yüksek malzeme maliyeti, uzun zaman ve kaynak gerektiren yöntemlerdir. Her bir parametrenin deney üzerindeki etkisini araştırmak için diğer bütün parametreler sabit tutularak her seferinde bir parametre değiştirilir. Böylece, parametrelerin arasında o anda değiştirilen parametrenin sisteme etkisi araştırılır. Bu durumda, parametrelerin aynı anda 4 ya da 5’den fazla seviyeleri olamaz. Örnek vermek gerekirse 5 parametrelili bir çalışmada her bir parametre 5 seviyeye sahip olursa toplam $5^5=3125$ farklı kombinasyon denenmesi gerekmektedir. Eğer deneysel hataları azaltmak için her bir deney en az 3 sefer tekrar edilmiş olsa toplam $3125 \times 3=9375$ deney yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak klasik ya da geleneksel yöntemlerle yapılan deney çalışmalarında eş zamanlı analiz mümkün olamamaktadır. Bu nedenle geleneksel yöntemler ile yapılan deneysel çalışmalarda parametreler arasındaki etkileşim göz ardı edilmektedir. Bütün bu problemler istatistiksel deney tasarım yöntemleri ile giderilebilir, aynı zamanda 25 deney ve istenilen tekrar sayısı ile çok yakın sonuçlar elde edilebilir (Gökçe ve Taşgetiren 2009).

Deney tasarımında, süreci etkileyen faktörlerin sistematik bir şekilde değiştirilmesiyle, sürecin sonunda elde edilen çıktılardaki değişkenlik değerlendirilmeye çalışılmaktadır. İstatistiksel deney tasarımlarında en çok geçen kavramlar faktör, seviye ve yanıt değişkenidir. Burada süreç üzerinde etkisi olabilecek ve kontrol edilebilir bağımsız

değişkenler “faktör”, bu değişkenlerin aldığı değerler ise “seviye” olarak adlandırılmaktadır. Seviye sayısal (numerik) veya kategorik olabilmektedir. Ayrıca, daha önce de belirtildiği gibi kontrol edilemeyen fakat süreç üzerinde etkisi olabilecek faktörlerden de bahsetmek mümkündür ki bunlar “gürültü faktörleri” olarak adlandırılmaktadır. Yanıt değişkeni ise, süreç sonunda elde edilen ve faktörlere bağlı değer alan değişkendir.

Deneylerden elde edilen, yanıt değişkenine ait verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için genellikle SAS, SPSS, MATLAB, MINITAB, DESIGN EXPERT gibi paket programlar kullanılmaktadır. Bu programlar, değerlendirme yaparken Varyans Analizi (ANOVA) kullanarak, faktörlerin yanıt değişkeni üzerindeki etkisinin istatistiksel açıdan anlamlılığını test eder. Ayrıca faktör etkilerinin yanı sıra deneysel hataların da etkisi istatistiksel olarak belirlenmektedir. ANOVA ile yanıt değişkeni üzerinde etkin olan faktörler belirlendikten sonra, regresyon analizi ile süreci tanımlayan bir model oluşturulur. Oluşturulan model, iki seviyeli faktöriyel tasarımlarda faktörlerin doğrusal etkilerini tanımlarken, cevap yüzeyi yöntemlerinde faktörlerin hem doğrusal (linear) hem de karesel (quadratic) etkilerini tanımlayabilmektedir (Sağol 2015).

İstatistiksel deney tasarımında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; tam faktöriyel tasarımlar, kısmi faktöriyel tasarımlar, rastsallaştırılmış tasarımlar, Plackett-Burman tasarımı, cevap yüzey tasarımları (Merkezi Bileşik Tasarım, Box-Behnken Tasarımı) vb. Belirtilen deneysel tasarım yöntemleri arasından incelenecek faktör sayısı ve istenen hedefe göre çizelge 2.1 kullanılarak deneysel tasarım yöntemi seçimi yapılabilir (<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri33.htm>, 2015).

Çizelge 2.1 Tasarım yöntemi seçimi

(<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri33.htm> 2015).

Faktör sayısı	Karşılaştırma hedefi	Seçme hedefi	Cevap yüzey hedefi
1	1 faktörlü tamamen rastsallaştırılmış tasarım	-	-
2-4	Rastsallaştırılmış blok tasarım	Tam ya da kısmi faktöriyel tasarım	Merkezi bileşik ya da Box-Behnken tasarımı
5 ya da daha fazla	Rastsallaştırılmış blok tasarım	Kısmi faktöriyel ya da Plackett-Burman tasarımı	Öncelikle faktör sayısını azaltmak için seçme

2.8.1 Plackett Burman tasarımı

Plackett ve Burman 1946 yılında 2-seviyeli kısmi faktöriyel tasarım yöntemi önermişlerdir. Bu tasarımda $k=N-1$ değişken için sadece N (4 'ün katıdır) adet deney gereklidir. Bu yüzden Plackett-Burman Tasarımı çok sayıda faktör olduğunda sık kullanılan bir tasarımdır (Montgomery 2001, Quinlan ve Lin 2015).

Plackett-Burman Tasarımı döngüsel bir yapıya sahiptir. Tasarımda her bir satırdaki/sütundaki son işaret diğer satırın/sütunun başına gelir. Bu yüzden döngüsel bir Placket- Burman Tasarımı oluşturmak için sadece ilk satıra/sütuna ihtiyaç vardır. İlk satırı/sütunu oluşturan $+$, $-$ dizilimi Plackett ve Burman (1946)'da verilmiştir. Her değer bir pozisyon sağa (ya da aşağıya) gider ve en uzaktaki veri de satırın/sütunun başına hareket eder. Bu prosesin tekrar etmesi $N-1$ 'inci satıra kadar devam eder. Son olarak tasarıma tümü “ $-$ ” (düşük seviye) olan bir satır eklenir. (Çizelge 2.2) (Montgomery 2001, Quinlan ve Lin 2015)

Çizelge 2.2 Plackett Burman Tasarımı (k=11, N=12) (Quinlan ve Lin 2015)

Deney no	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	x ₇	x ₈	x ₉	x ₁₀	x ₁₁
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Plackett-Burman deney tasarımı bağımsız değişkenlerin anlamlılık derecelerine göre elenmesini sağlayan etkili ve sık kullanılan bir deney tasarımıdır. Bu tasarımda incelenen maksimum faktör sayısı toplam deney sayısından bir azdır (11, 19, 27, ...) Sadece faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde Plackett-Burman deney tasarımı son derece etkin bir yaklaşımdır. Ancak ana etkenler ile iki faktör etkileşmelerinin etkisi üst üste geçtiğinden iki faktör etkileşmelerinin ihmal edilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla bu tasarım genellikle faktörlerin etkili/etkisiz şeklinde sınıflandırıldığı başlangıç aşamalarındaki çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışmayı takiben belirlenen kritik faktörler daha ileri deney tasarımlarına dahil edilir (Yerlikaya 2013).

İki düzeyli tam faktöriyel tasarımlarda çok sayıda faktör söz konusu olduğunda deney sayısı son derece fazladır (2^k ; k faktör sayısıdır). Dolayısıyla, k sayıda faktörün $k + 1$ sayıda deney ile incelenebildiği Plackett-Burman gibi iki düzeyli kısmi faktöriyel tasarımlar kullanışlı olabilmektedir. Bu şekilde harcanan zaman ve deney materyallerinde anlamlı azalmalar söz konusu olur (Yerlikaya 2013).

Plackett-Burman Tasarımı, istatistiksel bir yöntem olup birinci derece modele dayanır. Bu yöntem, bir deney sisteminde seçilen herhangi bir bağımlı parametre üzerinde,

sistemdeki diğer bağımsız parametrelerin etkisini lineer olarak veren bir bağımsız değişken elimine yöntemidir ve aşağıdaki eşitlik ile gösterilebilir.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i$$

Model açık ifadesi aşağıdaki şekildedir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_i X_i$$

Burada, Y cevap değişkenini, X_1 - X_i faktörleri (bağımsız değişkenleri), β_0 sabiti (model kayması) ve β_1 - β_i faktörlerin katsayılarını göstermektedir (Aytar vd. 2013, Yerlikaya 2013).

İki düzeyli deney tasarımlarında bağımsız değişkenlerin düzeylerini belirlemek çok önemli bir noktadır. Eğer düşük ve yüksek düzey arasındaki aralık çok dar ise aslında anlamlı bir faktör anlamsız olarak değerlendirilebilir veya tam tersi bir durumda, iki düzey arasındaki aralık çok geniş ise normal şartlar altında anlamsız bir faktör anlamlı olarak değerlendirilebilir ve diğer faktörlerin etkilerini maskeleyebilir (Yerlikaya 2013).

2.8.2 Cevap yüzey yöntemi (RSM)

Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology-RSM), bir cevap değişkeninin birçok faktörden etkilendiği durumda, bu cevap değişkeninin optimize edilmesi için, problemin modellenmesi ve analiz edilmesinde kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntemdir. Y cevap değişkeni olmak üzere, Y değerini maksimize etmek için bu değişkene etki eden x_1 ve x_2 parametrelerinin seviyelerinin bulunması istenmektedir. Y değerinin bu parametrelerin seviyelerinin fonksiyonu olduğunu gösteren matematiksel ifade:

$$Y = f(x_1, x_2) + \epsilon$$

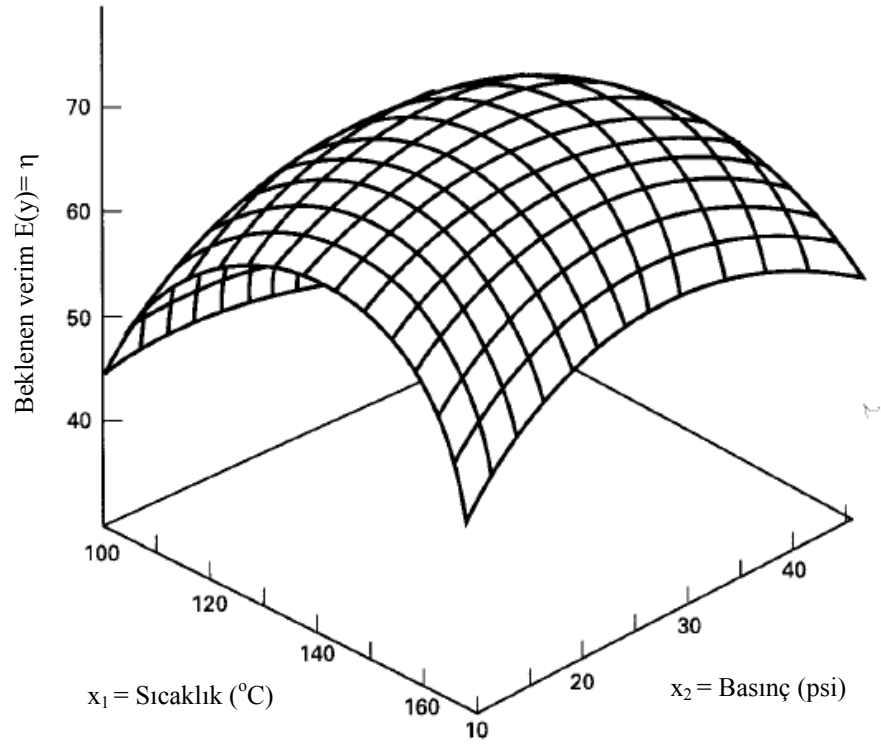
şeklinde gösterilir. Burada ϵ , cevap değişkeni olan Y üzerindeki hata ya da gürültü değeridir. Eğer beklenen cevap değişkeni açıklanmak istenirse;

$$E(Y) = f(x_1, x_2) = \eta$$

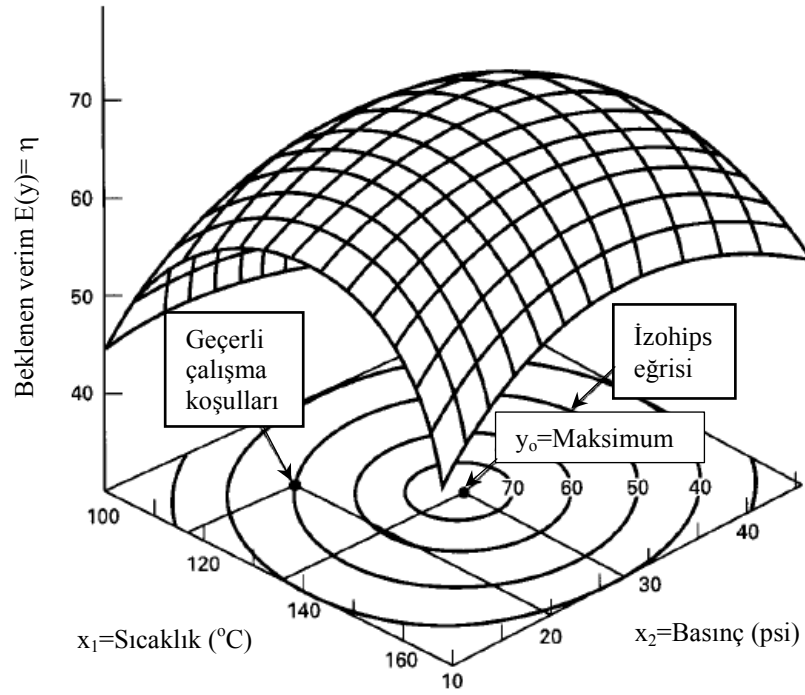
şeklinde ifade edilir. Bu durumda yüzey

$$\eta = f(x_1, x_2)$$

ifadesiyle gösterilir ve cevap yüzeyi olarak adlandırılır ve cevap yüzeyi grafiksel olarak şekil 2.22'deki gibi gösterilir. Burada η , x_1 ve x_2 seviyelerine karşı çizilmiştir. Cevap değişkeni üç boyutlu çizilmiş bir yüzey olarak gösterilmiştir. Cevap yüzeyinin şeklini daha iyi anlayabilmek için cevap yüzeyinin izohips eğrileri (eş yükselti eğrisi, kontur) kullanılır (Şekil 2.23). Bu grafiklerde çizgiler farklı x_1 ve x_2 değerlerinde cevap değişkeninin sabit olduğu yerleri ifade etmektedir. Her bir izohips eğrisi cevap yüzeyinde özel bir yüksekliği göstermektedir. İzohips eğrisi grafikleri çalışılan farklı x_1 ve x_2 seviyelerinin cevap yüzeyinin yüksekliğine ya da şekline göre cevapta yapacağı değişikliği gösterir (Montgomery ve Runger 2007).



Şekil 2.22 x_1 (sıcaklık) ve x_2 'nin (basınç) fonksiyonu olarak η 'yı (beklenen verim) gösteren üç boyutlu cevap yüzeyi (Montgomery 2001)



Şekil 2.23 Bir cevap yüzeyinin izohips eğrisi çizimi (Montgomery 2001)

Birçok RSM probleminde cevap ve bağımsız değişken arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bu yüzden, RSM’de ilk basamak Y ve bağımsız değişkenler arasındaki doğru ilişki için uygun yaklaşımı bulmaktır. Genellikle, düşük dereceli polinomlar kullanılır. Eğer cevap değişkeni bağımsız değişkenlerin lineer fonksiyonuyla modellenirse, 1. derece model fonksiyonu;

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \epsilon$$

Burada, Y cevap değişkenini, β_0 sabit terimi, β_i doğrusal parametrelerin katsayılarını, x_i değişkenleri, k değişken sayısını ve ϵ deneysel hatayı veya gürültüyü ifade etmektedir (Montgomery ve Runger 2007, Bezerra vd. 2008).

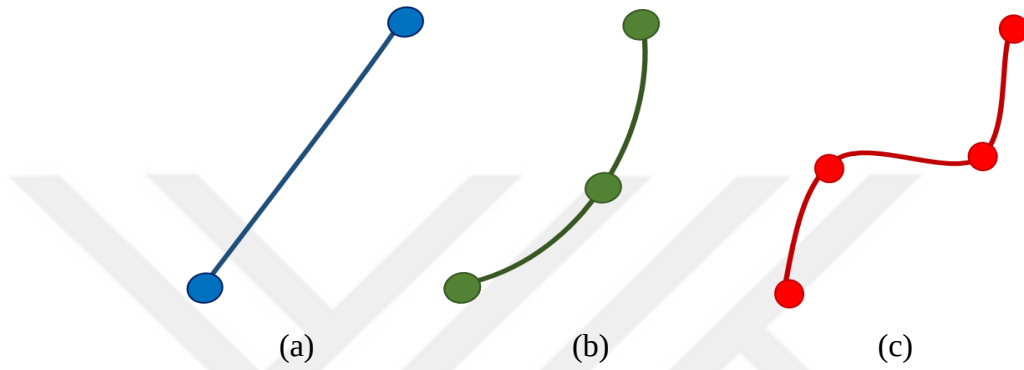
Eğer sistemde eğrisel bir ilişki varsa, polinom daha yüksek dereceli olarak kullanılmalıdır. Örneğin, 2. dereceden model;

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

Bu eşitlikte β_{ij} etkileşim parametrelerinin katsayılarını, β_{ii} ikinci dereceden parametrelerin katsayılarını ifade etmektedir (Montgomery ve Runger 2007, Bezerra vd. 2008).

İstatistiksel deney tasarımında, etkisi incelenen faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisi şekil 2.24–(a)’da görüldüğü gibi **doğrusal** olduğu durumlarda elde edilecek regresyon modeli birinci dereceden olacaktır. Şekil 2.24–(b)’de görülen ise, faktörlerin cevap değişkeni üzerine etkisi **ikinci dereceden** regresyon modeli olduğu durum için geçerlidir. İkinci dereceden etkilerin regresyon modeli ile tanımlanabilmesi için faktörlerin en az 3 farklı seviyesinde deneylerin gerçekleştirilmesi gereklidir. Şekil 2.24–(c)’de gösterilen **kübik** etkinin tanımlanabilmesi için ise faktörün en az 4 seviyesinin denenmiş olması gerekir. RSM yöntemlerinin tamamında faktörlerin en az 3

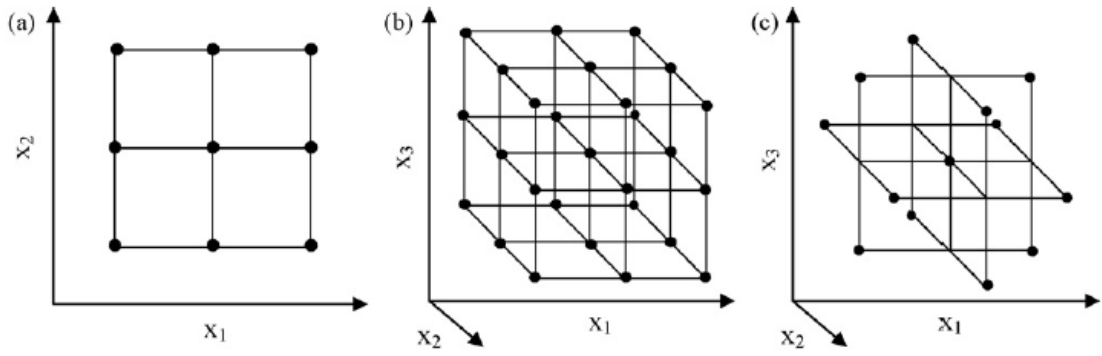
farklı seviyesinde deneyler gerçekleştirildiği için olası bütün faktör etkilerinin (doğrusal veya ikinci dereceden) tanımlanması mümkün olmaktadır (Sağol 2015, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, 2018). İkinci dereceden tasarım yöntemleri arasında en yaygın kullanılanları 3 seviyeli faktöriyel tasarım, Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design-CCD) ve Box-Behnken Tasarımı (Box-Behnken Design-BBD)'dir.



Şekil 2.24 İncelenen faktörlerin cevap değişkeni üzerindeki etkisi (a) doğrusal fonksiyon (b) ikinci dereceden fonksiyon (c) kübik fonksiyon (<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, 2018))

2.8.2.1 Üç seviyeli faktöriyel tasarım

Bu tasarım yöntemini RSM'de kullanabilmek için faktör sayısı 2'den büyük olmalıdır. Bu tasarım yönteminde istenen deney sayısı $N=3^k$ ile ifade edilmektedir. Burada k faktör sayısını, N deney sayısını göstermektedir. Bu tasarım yönteminde deney sayısı çok fazladır. Pratikte daha az sayıda deneyle ikinci dereceden fonksiyonların modellenmesi için Box-Behnken Tasarımı ve Merkezi Bileşik Tasarım daha çok kullanılmaktadır. Şekil 2.25 (a) ve (b)'de sırasıyla 2 ve 3 değişkenli optimizasyon için 3 seviyeli faktöriyel tasarımların deneysel tasarımı görülmektedir (Bezerra vd. 2008).



Şekil 2.25 Tüm değişkenlerin 3 seviyeli olduğu deneysel tasarım: (a) 2 değişkenli (b) 3 değişkenli optimizasyon için 3 seviyeli faktöriyel tasarım (c) 3 değişkenli optimizasyon için Box-Behnken Tasarımı

2.8.2.2 Box-Behnken tasarımı

Box ve Behnken matematiksel modelin birinci ve ikinci dereceden katsayılarının etkili tahminini sağlayan, 3 seviyeli faktöriyel tasarımın noktalarının nasıl seçilmesi gerektiğini önermişlerdir. Böylece 3 seviyeli faktöriyel tasarıma göre (3^k) daha etkili ve daha ekonomik bir yol izlenir. Box-Behnken Tasarımında deneysel noktalar merkez noktasından eşit uzaklıkta bir küre şeklindedir (Şekil 2.25-(c)).

Temel özellikleri:

- 1) Bu tasarım için $N=2k(k-1) + C_p$ adet deney gerekmektedir. Burada k faktör sayısı, C_p merkez noktadaki deney sayısıdır.
- 2) Tüm faktör seviyeleri 3 seviyede (-1, 0, 1) ve eşit aralıklı olmalıdır.

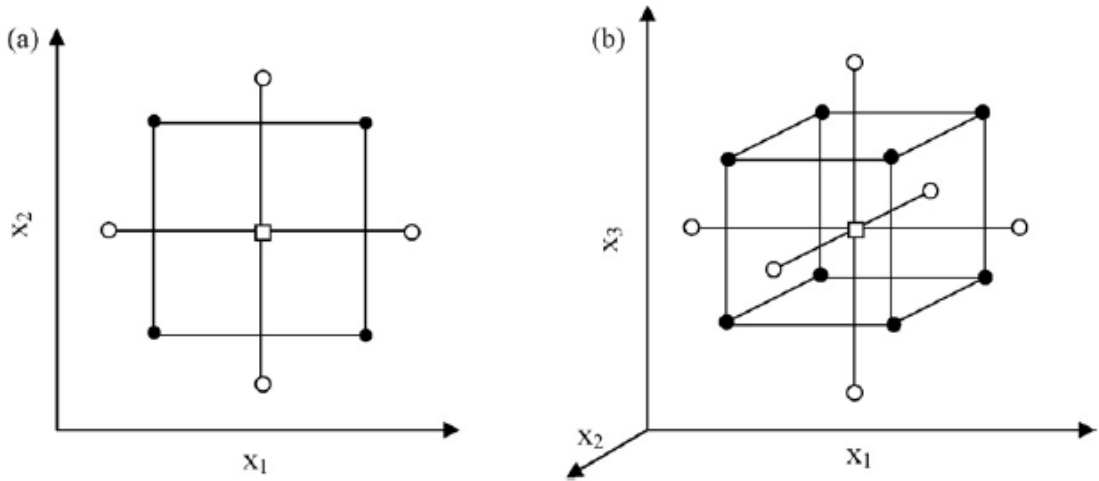
Buna göre şekil 2.25-(c)'de görüldüğü gibi 3 değişkenli Box-Behnken Tasarımı için 13 deney noktası vardır. Şekil 2.25-(b)'de görülen faktöriyel tasarımla karşılaştırıldığında ($3^3=27$ deney) bu tasarım daha ekonomik ve etkilidir. Bu deneysel tasarım yöntemi birçok kimyasal ve fiziksel prosesin optimizasyonunda uygulanmaktadır (Bezerra vd. 2008).

2.8.2.3 Merkezi bileşik tasarım (Central composite design-CCD)

Bu tasarım Box ve Wilson tarafından bulunmuştur. Şu bölümleri içermektedir:

- 1) Bir tam faktöriyel ya da kısmi faktöriyel tasarım
- 2) Ek bir tasarım (daha çok merkezden bir α uzaklığında deneysel noktaların olduğu yıldız tasarımı)
- 3) Bir merkez nokta

Şekil 2.26-(a) ve (b) sırasıyla 2 değişkenli ve 3 değişkenli tam CCD optimizasyonlarını göstermektedir.



Şekil 2.26 (a) 2 değişkenli ($\alpha=1.41$) (b) 3 değişkenli ($\alpha=1.68$) optimizasyon için CCD: (●) faktöriyel tasarım noktaları, (○) aksel noktalar, (□) merkez nokta

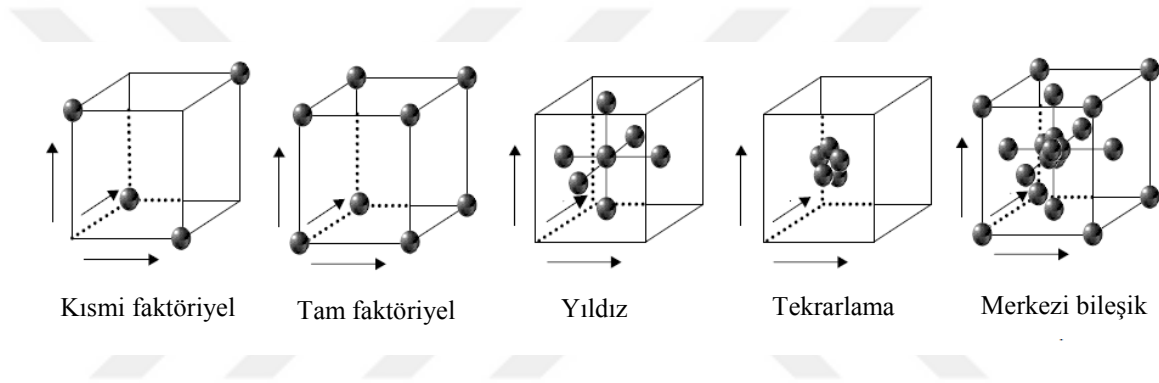
Tamamen döndürülebilir CCD özellikleri:

- 1) Bu tasarım için $N=k^2+2k+C_p$ deney gereklidir. Burada k faktör sayısı, C_p merkez noktada tekrar sayısını göstermektedir.
- 2) α değeri değişken sayısına bağlıdır ve $\alpha=2^{(k-p)/4}$ ile hesaplanır. 2, 3, 4 değişken için sırasıyla 1.41; 1.68; 2.00'dır.
- 3) Tüm faktörler 5 seviyede çalışılır ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

Bu deneysel tasarım yöntemleriyle klasik yöntemlere göre çok daha az deney ile daha çok bilgi elde edilmektedir. Ayrıca parametreler arasındaki etkileşimlerin cevap değerine etkisi de hesaba katılmış olur.

Deneysel optimizasyon yöntemiyle bir deneysel tasarım yöntemi seçilir, mevcut proses matematiksel fonksiyon ile ifade edilir, modelin kalitesi değerlendirilir ve belli bir kesinlikle deneysel verilerle ilişkili olarak bir öngörü elde edilebilir (Bezerra vd. 2008).

CCD'i oluşturan öğeler şekil 2.27'de verilmiştir (Brereton 2003).



Şekil 2.27 CCD'i oluşturan öğeler

RSM deneysel verilere uyan polinomik eşitliği temel alan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bütünüdür. Belirlenen polinomik eşitlik istatistiksel bir öngörü sağlayarak deney setinin davranışını gösterir. Bu birçok değişkenden etkilenen bir cevap faktörü ya da cevap faktörleri olduğunda uygulanır. En iyi sistem performansını elde etmek için bu değişkenlerin seviyelerini optimize eder (Bezerra vd. 2008).

Bir optimizasyon tekniği olarak RSM'nin uygulanma aşamaları şu şekildedir:

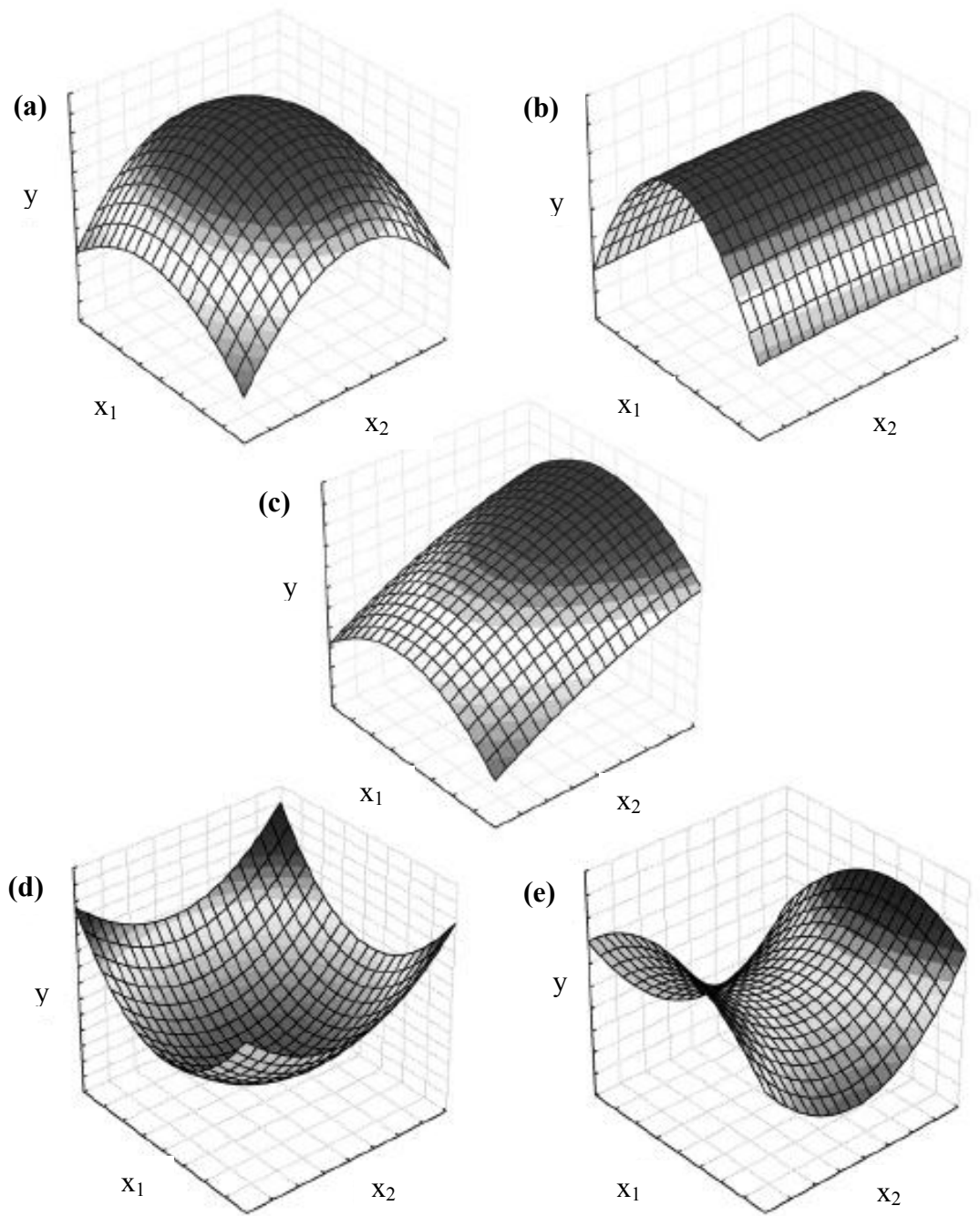
- 1) Sistem üzerinde ana etkileri olan bağımsız değişkenlerin seçilmesi
(Bu, araştırmacının tecrübesine, çalışmanın hedefine göre deneysel bölgenin sınırlamaları ve yapılan çalışmalara dayanarak yapılır.)
- 2) Deneysel tasarım yönteminin seçilmesi ve seçilen deneysel matrise göre deneylerin gerçekleştirilmesi

- 3) Elde edilen deneysel verilerin matematik-istatistikî yöntemlerle polinomik bir fonksiyona uydurulması
- 4) Modelin uygunluğunun değerlendirilmesi
- 5) Optimum bölgeye doğru gidilip o bölgede çalışılıp olasılığın doğrulanması
- 6) Çalışılan her bir değişken için optimum değerlerin elde edilmesi (Bezerra vd. 2008).

İkinci dereceden modeller için kritik nokta maksimum, minimum ya da eyer şekli olarak karakterize edilir. Kritik noktanın koordinatlarını hesaplamak için matematiksel fonksiyonun türevi alınıp sifıra eşitlenebilir. Bu türev denklemi cevap yüzeyini tasvir eder.

Tahmin edilen model eşitliğinin görselleştirilmesi cevap yüzeyi grafiğiyle yapılabilir. Bu grafik (n+1) boyutlu uzayda n-boyutlu bir yüzeyi gösterir. Genellikle 3 boyutlu grafikte 2 boyutlu gösterim şeklindedir. Bu yüzden 3 ya da daha fazla değişken varsa bir değer sabit tutulup bir ya da daha fazla değişkenin grafik gösterimi şeklinde mümkündür. Şekil 2.28 iki değişkenin optimizasyonunda 2. dereceden cevap yüzey grafik profillerinin bazılarını göstermektedir (Bezerra vd. 2008).

Şekil 2.28 (a) ve (b); deneysel bölge içinde yer alan maksimum noktayı içeren yüzeyleri göstermektedir. Şekil 2.28-(b); x_2 'yle ilişkili bir platonun olduğu ve x_2 'nin seviyesindeki değişikliklerin çalışılan sistemi etkilemediği görülmektedir. Şekil 2.28-(c)'de; deneysel bölgenin dışında bir maksimum nokta var ve onun yerini değiştirmek için eğer mümkünse başlangıç tasarımına gidilmesi gerekir. Şekil 2.28-(d)'deki yüzey bir minimum nokta göstermektedir. Şekil 2.28-(e)'deki yüzey kritik nokta olarak bir eyer noktası göstermektedir. Eyer noktası bağıl bir maksimum ve bağıl bir minimum arasında bir dönüm noktasıdır. Eğer çalışılan sistemde bir maksimum ya da minimum cevap elde etmek amaçlanıyorsa, eyer noktası koordinatları optimum değerler olarak düşünülemez. Optimum bölgeyi bulmak, yüzeylerin tekrar görsel incelemesiyle mümkündür.



Şekil 2.28 İki değişkenli optimizasyonda ikinci dereceden bir modelden üretilen cevap yüzeyinin bazı profilleri (a) maksimum (b) plato (c) maksimum nokta deneysel bölgenin dışında (d) minimum (e) eyer yüzeyi (Bezerra vd. 2008)

2.9 Kaynak Özetleri

Bu çalışma kapsamında enantiyomerik saflıkta β -bloker elde etmek için iki yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler;

- Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi
- Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonudur.

Bu iki yöntemle ilgili literatürde yer alan çalışmalar özetlenmiştir.

2.9.1 Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile β -bloker öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi

Enantiyomerik saflıktaki halohidrinler, kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan adrenerjik β -bloker'ların sentezlenmesinde çıkış maddeleridir. Farklı aril gruplarına sahip kiral halohidrinler, çeşitli adrenerjik β -bloker'ların (propranolol, nadolol, atenolol, metoprolol) sentezlenmesinde kullanılırlar.

Literatürde halohidrinlerin eldesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, (R,S)-halohidrinlerin lipaz katalizli rezolüsyonu veya asetatlarının lipaz katalizli hidroliziyle optikçe saf halohidrin eldesidir. Ancak bu tepkimelerde verim en fazla % 50'dir ve pahalı katalizörlere ihtiyaç vardır (Martinez vd. 2000). Bu çalışma kapsamında incelenen yöntem ise, haloketonların stereoseçimli indirgenmesiyle optikçe saf halohidrin eldesidir. Stereoseçimli indirgenme tepkimelerinde verim % 50'den yüksek olabilmektedir. Stereoseçimli indirgenme tepkimesi, (S)-adrenergik β -bloker'ların sentezlenmesinde anahtar tepkimedir (Martinez Lagos vd. 2004).

Martinez vd. (2000) α -haloketonların maya katalizli indirgenmesi ile β -bloker öncüleri halohidrinlerin üretimini gerçekleştirmişlerdir. Birçok proses parametresinin verim ve ee'ye etkisi araştırılmıştır. Baker's yeast izoenzimlerinin etil kloroasetat ya da metil vinil keton kullanılarak seçimli inhibisyonu gerçekleştirilmiştir. Seçimli inhibitör (25

mM) olarak metil vinil keton kullanılarak *Saccharomyces cerevisiae*'nın S-enantiyoseçimliliğinin R-enantiyoseçimliliğe dönüşebileceği gözlenmiştir. Taze çoğalmış hücreler (fresh resting cells) kullanıldığı durumda, çoğalmakta olan hücreler (growing cells) kullanıldığı durumdan daha iyi verim ve ee elde edilmiştir. Bu durumun direk hücre üreme ortamındaki hücreler kullanıldığında meydana gelen sekonder metabolik tepkimeler ile substratın ya da ürünün dönüşümünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı mayalar kullanılarak indirgenme tepkimesi gerçekleştirilmiş, *Yarrowia lipolytica* 1240 taze hücreleri ile (S)-1-kloro-3(1-naftiloksi)propan-2-ol % 87 verim ve % 99 ee ile elde edilmiştir. *Pichia mexicana* 11105 hücreleri ile ise (R)-1-kloro-3(1-naftiloksi)propan-2-ol (propranolol öncüsü) % 85 verim % 95 ee ile elde edilmiştir.

1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-onun baker yeast's mayası (*S. cerevisiae*, tip II, Sigma) ile indirgenmesinde enantiyoseçimliliğe reaksiyon koşullarının etkisi araştırılmıştır. Kullanılan maya miktarı arttıkça verimin arttığı fakat ee değerinin neredeyse sabit kaldığı gözlenmiştir. Kullanılan tamponun farklı pH değerlerinde çalışıldığında ee ve verimde küçük farklılıklar gözlenmiştir. Reaksiyon süresi arttığında verimin arttığı fakat ee değerinin çok az düştüğü gözlenmiştir. Fosfat tamponunun pH değeri arttığında prosesin stereoseçimliliğinin arttığı gözlenmiştir. Farklı haloetonların stereoseçimli indirgenmesi gerçekleştirilmiştir. Tüm durumlarda ee değerinin çok yüksek olmadığı ve tüm durumlarda S-stereoseçimliliğin olduğu gözlenmiştir.

Martinez Lagos vd. (2002) 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-onun maya katalizli indirgenmesi ile R ya da S-1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol'ün (2-propranolol öncüsü) sentezini incelemişlerdir. Çalışmada birçok maya türü reaksiyon testi olarak sikloheksanonun indirgenmesinde kullanılarak en iyi türler seçilmiştir. Seçilen bu türler *S. cerevisiae* ticari türünden daha aktif ve üreticidir.

- Maksimum verim açısından sıralanacak olursa:

Y. lipolytica 1240 > *S. cerevisiae* 1317 > *P. mexicana* 11105 > *S. bayanus* 1969 > *S. cerevisiae* Type II from Sigma

- Bağlı üreticilik açısından ise:

S. cerevisiae 1317 > *Y. lipolytica* 1240 > *P. mexicana* 11015 ~ *S. bayanus* 1969 >> *S. cerevisiae* Type II

1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-onun indirgenmesinde *S. cerevisiae* 1317, *S. bayanus* 1969 ve *P. mexicana* 11015 (R)-enantiyomerini verirken, *Y. lipolytica* 1240 ve *S. cerevisiae* Type II (S)-enantiyomerini vermektedir. 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-onun stereoseçimli indirgenmesi çoğalmış taze hücreler alınıp kullanılarak ya da çoğalmakta olan hücrelerin ortamında gerçekleştirilmiştir. *Yarrowia lipolytica* 1240 taze hücreleri ile S-1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol % 87 verim ve % 99 ee ile elde edilmiştir. *Pichia mexicana* 11015 hücreleri ile ise R-1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol (propranolol öncüsü) % 85 verim % 95 ee ile elde edilmiştir.

Martinez Lagos vd. (2004) baker's yeast kullanarak ariloksi-halo-2-propanonların ve 1-kloro-3(ftalimidil)-propan-2-onun stereoseçimli indirgenmesini gerçekleştirmişler ve genellikle düşük verim ve/veya ee elde etmişlerdir. *S. cerevisiae* (type II) ile farklı aril gruplarına sahip ariloksi-halo-2-propanonların indirgenmesi gerçekleştirilmiş, prosesin stereoseçimliliğinin aril grubunun büyüklüğü ile arttığı gözlenmiştir. Böylece aril grubunun büyüklüğünün önemli bir faktör olduğu anlaşılmıştır. Ketonların indirgenmesinde mikroorganizmaların taranması sonucu üç yeni maya (*Saccharomyces bayanus* CECT 1317, *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 ve *Pichia mexicana* CECT 1015) seçilmiştir. Bu mayalar ariloksi-halo-2-propanonların ve 1-kloro-3(ftalimidil)-propan-2-onun stereoseçimli indirgenmesinde kullanılmıştır. *P. mexicana* (ariloksi-halo-2-propanonların indirgenmesinde) ve *S. bayanus* (1-kloro-3(ftalimidil)-propan-2-onun indirgenmesinde) kullanılarak sırasıyla R ve S-halohidrinler >% 90 ee ve >% 85 verim ile elde edilmiştir. Ayrıca deneyler sırasında aynı cins mikroorganizmaların farklı türlerinin aynı reaksiyonda farklı stereoseçimlilik gösterebileceği gözlenmiştir.

Carballeira vd. (2004) redüktaz aktivitesi gösteren (oksidaz aktivitesi olmayan) mikroorganizmaları araştırmak için 416 tür taramışlardır. Patojen olmayan bir tür olan *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018 halkalı ketonların indirgenmesinde çok

yüksek aktivite ve stereoseçimlilik göstermiştir. Tek ya da iki halkalı ketonlara seçimliliği, kolay kültür koşulları ve ölçek büyütme koşullarına sahip olduğundan bu mantar seçilmiştir. Geleneksel ketonların indirgenmesinde *S. cerevisiae* (type II)'den daha aktiftir ve yüksek keton derişimlerinde (<60 mM) çalışılabilir.

Martinez Lagos ve Sinisterra (2005) çalışmalarında ketonların indirgenmesinde iki aktif mayayı kalsiyum aljinata tutuklamışlardır. Alkol dehidrojenazın maksimum üreticiliği *Yarrowia lipolytica* için durgun fazın başlangıcında (48 sa), *Pichia mexicana*'nın ise logaritmik fazında (12 sa) gerçekleşmiştir. Tutuklamanın deneysel koşulları faktöriyel deneysel tasarımıyla optimize edilmiştir. Sodyum aljinat çözeltisinin hacmi, çözeltideki sodyum aljinat yüzdesi, tutuklanan hücre miktarı ve keton miktarının etkisi incelenmiştir. Cevap değişkeni olarak ıslak tanecik ağırlığı, sikloheksanoldeki verim ve reaksiyonun üreticiliği (% sikloheksanol/g ıslak tanecik) seçilmiştir. Yapılan deneysel tasarıma göre en iyi tutuklama koşullarının 10 mL aljinat, % 0.5 aljinat, 20 mL kültür ortamı ve 10 µL sikloheksanon olduğu bulunmuştur.

P. mexicana'nın çoğalmış (resting) hücreleri ile karşılaştırıldığında tutuklanmış hücrelerle enzim aktivitesinin bir miktar azaldığı, *Y. lipolytica* kullanıldığında ise aktivitenin korunduğu gözlenmiştir. Ketonların indirgenmesinde tutuklanmış hücrelerin en azından 5 kez tekrar kullanılabileceği gözlenmiştir. *P. mexicana* ile R-halohidrin % 80 verim ve % 96 ee ile elde edilirken *Y. lipolytica* ile S-halohidrin % 80 verim ve % 95-97 verim ile elde edilmiştir.

Rampal vd. (2007) prokiral bileşik 3-feniltiyopropan-2-on'un *Bacillus* sp. türü AO1 ile indirgenmesinde enzimin enantiyoseçimliliğinin üreme ortamındaki maya özütü ve glikoza bağlı olduğunu saptamışlardır. Düşük derişimlerde maya özütü (% 0.1-0.9) 3-feniltiyopropan-2-ol'ün S-enantiyomerinin oluşumunu desteklemiştir (% 62 ee, % 0.1 maya özütü). Fakat MSM (mineral tuzlar ortamı) ortamına % 1 ya da daha fazla maya özütü eklendiğinde indirgenmiş ürünün R-enantiyomeri oluşmuştur (% 2 maya özütü eklendiğinde maksimum ee % 85'tir).

2.9.2 Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu

Ucuz bir rasemik substrat ya da atık enantiyomerin aynı tepkime kabındaki bir proste çok katalizörle aynı anda tepkime gerçekleştirilerek değerli enantiyomerik ürünlerin % 100 verim ve % 100 ee ile elde edilmesi son zamanlarda ilgilenilen bir konudur. Katalitik (asimetrik) ard arda tepkimelerin gerçekleştiği proseslerde birden fazla katalizör aynı tepkime kabında aynı anda kullanılarak çok basamaklı biyosentezle ara ürünlerin saflaştırılması için zaman kaybı önlenmektedir (Li vd. 2010, Schrittwieser vd. 2011, Wohlgemuth 2010). Fakat, burada en önemlisi de farklı katalitik tepkimelerin birbirini etkilememesidir (Li vd. 2010). Çoklu enzim sistemi ile stereoinversiyon yönteminde farklı stereoseçimliliğe sahip iki enzim katalizörlüğünde ardışık yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri ile enantiyomerik saflıkta ürün elde edilebilmektedir.

Çalışma kapsamında enantiyomerik saflıkta β -bloker elde etmek için kullanılan ikinci yöntem bir sekonder amino alkol olan rasemik propranololün (β -bloker) çoklu enzim sistemi kullanılarak biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimidir. Literatürde sekonder amino alkollerin biyotransformasyonu ile ilgili sadece (Damle vd. 2000) çalışması vardır. Bu çalışmada gerçekleştirilen yöntem derasemizasyon olarak adlandırılmasa da birer sekonder amino alkol olan rasemik propranolol ile rasemik atenololün ve asetatlarının *Rhizopus arrhizus* (NCIM 997) ve *Geotrichum candidum* (NCIM 980) fungusları ile biyotransformasyonu incelenmiştir. Bunun sonucunda, S-propranolol ve S-atenolol iyi optik verimle elde edilmiştir. Bu biyotransformasyonlarda süre ve pH etkisi incelenmiştir. Süre etkisi incelendiğinde (2-8 gün) atenolol, propranolol ve asetatlarıyla bu iki mikroorganizma ile gerçekleştirilen tüm biyotransformasyonlarda en yüksek % ee değerleri 6 günde elde edilmiştir. pH etkisi incelendiğinde (pH 6.8; 7; 7.4) propranolol ve atenolol ile her iki mikroorganizma ile de pH 7'de 6 günde en yüksek % ee değerleri elde edilmiştir. Rasemik propranolol ve atenololün kendileriyle asetatlarına göre daha yüksek sonuçlar bulunmuştur. Rasemik propranololün *G. candidum* ile biyotransformasyonunda S-propranolol % 78 ee ve % 73 verimle elde edilirken *R. arrhizus* ile % 88 ee ve % 74 verimle elde edilmiştir.

Literatürde sekonder amino alkollerin derasemizasyonu ile ilgili başka bir çalışma olmadığı için çoklu enzim sistemi ile çeşitli sekonder alkollerin biyokatalitik derasemizasyonuna yönelik çalışmalar incelenmiştir:

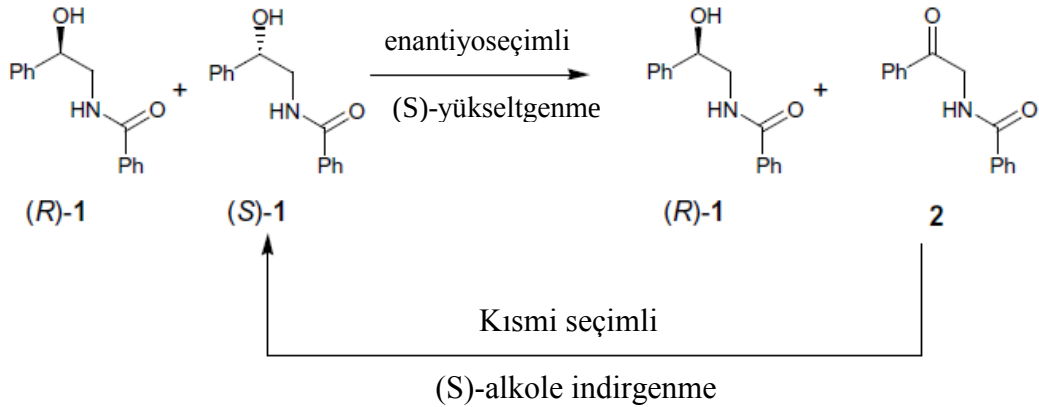
Allan ve Carnell (2001) sekonder alkollerin yüksek enantiyoseçimlilikle yükseltgenmesini katalizleyen *Sphingomonas paucimobilis* NCIMB 8195'in farklı aril ve heteroaril alkollerin derasemizasyonunu etkili olarak katalizlediğini gözlemişlerdir. Bu tepkimelerde R-alkol % 90 verimle elde edilmiştir. Biyotransformasyon sırasında alkollerin yükseltgenerek çeşitli miktarlarda ketonların oluştuğu gözlenmiş ve S-alkolün ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri ile stereoinversiyonunun gerçekleştiği anlaşılmıştır. 1-fenil etanolün derasemizasyonu sonucu R-1-fenil etanol % 81 verim, % 97 ee ile elde edilmiştir.

Comasseto vd. (2004) çalışmasında *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A. terreus* CCT 3320 ve *Rhizopus oryzae* CCT 4964 mantar hücreleri (tüm hücre) ile birçok p-konumlu aril etanollerin enantiyoseçimli derasemizasyonu ile p-konumlu asetofenonların indirgenmesi gerçekleştirilmiş ve alkoller >% 99 ee ile elde edilmiştir. Asetofenonların mikrobiyal indirgenmesinde en iyi sonuçlar *R. oryzae* CCT 4964 ile elde edilmiştir (% 70-90 dönüşüm, >% 99 ee). p-konumlu aril etanollerin enantiyoseçimli derasemizasyonunda *Aspergillus terreus* CCT 4083 ve *A. terreus* CCT 3320 tüm hücreleri kullanılmış ve kullanılan substratların çoğu ile yüksek ee (>% 99) elde edilmiştir.

Cardus vd. (2004) çalışmalarında bir amidoalkol olan rasemik N-(1-hidroksi-1-feniletıl) benzamid'in *Cunninghamella echinulata* NRRL1384 mikroorganizması (tüm hücre) ile mikrobiyal derasemizasyonu ile R-enantiyomerinin üretimini gerçekleştirmişlerdir. Derasemizasyon, amidoalkolün hızlı S-seçimli yükseltgenmesi ve ardından daha yavaş olan ketonun kısmi S-seçimli indirgenmesi şeklinde gerçekleşmiştir.

Denenen 12 tür içerisinde model substrat olan amidoalkolü dönüştüren *C.echinulata* derasemizasyon prosesinde kullanılmış ve % 57 verim (R-amidoalkol), % 92 ee elde

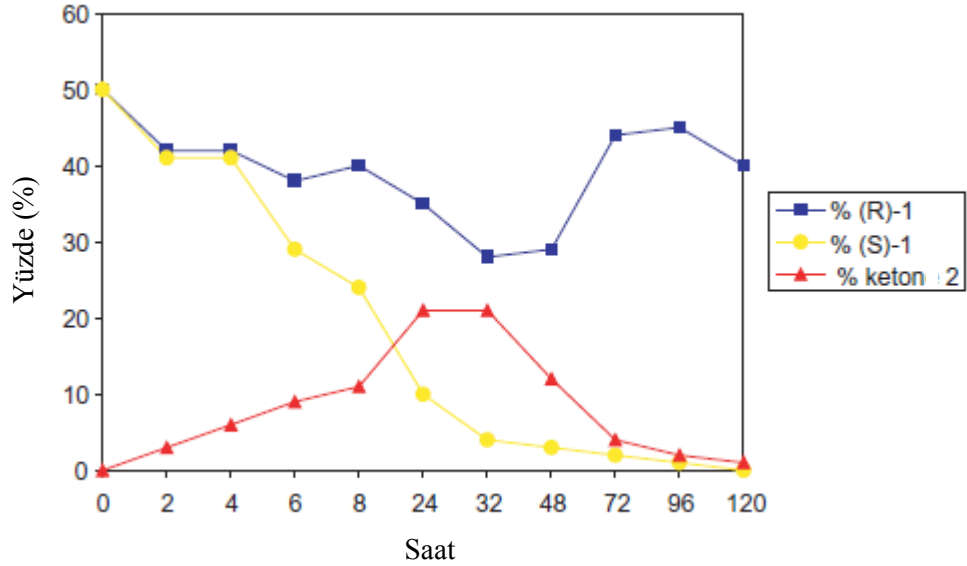
edilmiştir. Tepkime karışımında bulunan keton miktarı ise % 4'tür. Bu da derasemizasyonun hücre içindeki redoks enzimleri ile katalizlendiğini göstermektedir. Tepkime sadece R-amido alkol ile gerçekleştiğinde 6 gün sonunda ketona da S-amido alkole de hiç dönüşüm olmamıştır. Bu da derasemizasyonun rasemik substratın S-seçimli yükseltgenmesiyle gerçekleştiğini düşündürmektedir. Sadece ketonun biyotransformasyonu gerçekleştirildiğinde ise 2 günde % 26 ee(S), % 17 verim elde edilirken 4 günde % 58 ee(R), % 17 verim elde edilmiştir. Buna göre 2 gün sonra keton düşük seçimlilikle indirgenmiş ve (% 26 ee) ve S-amido alkol oluşmuştur. 4. ve 6. günlerden sonra ise R-enantiyomeri artmaya başlamıştır. Amido alkol ve keton verimlerinin çok düşük olması yarışmalı bir degradasyon prosesinin varlığını göstermektedir. Buna göre burada bir enzim S-amido alkolün ketona enantioseçimli yükseltgenmesini katalizlerken R-amido alkol kalmaktadır. İkinci bir enzim de ketonu kısmi seçimlilikle S-amido ketona indirgemektedir. Böylece yükseltgenme yüksek seçimlilikle diğeri kısmi seçimlilikle yürüyerek döngüler sonrasında derasemizasyon gerçekleşir (Şekil 2.29).



Şekil 2.29 N-(1-hidroksi-1-feniletıl) benzamid'in derasemizasyonu

Alkolün verim ve % ee'sini optimize etmek ve mekanizmayı anlamak için tepkime detaylı incelenmiş ve zamanla alkol ve keton yüzdeleri incelenmiştir (Şekil 2.30). Buna göre kütle dengesi zayıftır. 120 saat sonra başlangıçtaki miktarın sadece % 40'ı elde edilebilmiştir. Bunun da maddelerin biyokütle içinde kalmasından, hücrelerin metabolizmasında kalmasından ya da hücre dışı bir enzim tarafından biyodönüşüm gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Biyotransformasyonun ilk 32 saati

boyunca R-amido alkol derişimi yavaş olarak azalırken, S-amido alkol hızlıca azalmış, keton miktarı artmıştır. 32 saat sonra keton miktarı azalırken R-amido alkol miktarı artmıştır. Bu sonuçlar S-amido alkolü ve/veya ketonu yarışmalı olarak tüketen bir prosesin olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.30 Rasemik N-(1-hidroksi-1-feniletil) benzamid'in *C.echinulata* ile derasemizasyonunun zamanla ilerleyişi

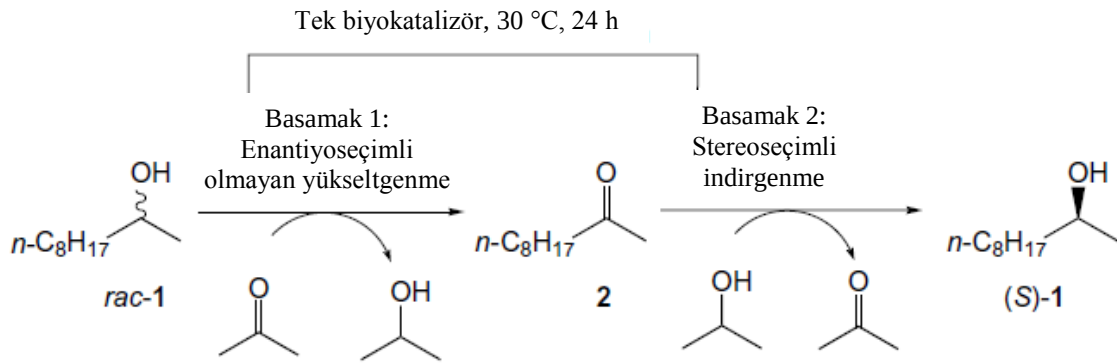
Bir de biyotransformasyon ortamına glikoz eklenmesinin etkisi araştırılmıştır. Eğer indirgenme hız kısıtlayıcı basamaksa ve yarışmalı proseslerin gerçekleşmesini kolaylaştırıyorsa, glikoz eklenerek biyoindirgenme hızlandırılıp madde kaybı azaltılabilir. Bunun için glikoz tepkimeye 2 g/L derişiminde, farklı aralıklarla eklenmiştir. Buna göre glikoz daha sık aralıklarla eklendiğinde alkol oranı yüksekken % ee(R) düşük elde edilirken, daha geniş aralıklarla eklendiğinde % alkol oranı düşmüş % ee(R) artmıştır. Bu da redüktaz aktivitesinin seçimli olarak S-amido alkol oluşumunu sağladığı ve glikoz daha fazla eklendiği zaman % alkol oranının artmasından, madde kaybının yarışmalı prodesten kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bir de keton substrat olarak kullanılarak aralıklarla glikoz eklenmesinin etkisi incelenmiş ve beklendiği gibi glikoz eklemesinin olmadığı duruma göre daha yüksek verim (% R) ve daha düşük % ee elde edilmiştir.

Ürün kazanımını gerçekleştirme olasılığı ve pH etkisini araştırmak için *C. echinulata* üretildikten sonra (resting cell) biyotransformasyonda kullanılmıştır. Fosfat tamponunda pH 5-9 aralığında tepkimeler gerçekleştirildiğinde bu mikroorganizmanın geniş bir pH toleransı olduğu görülmüştür. pH 9 hariç tüm biyotransformasyonlarda verimler üremekte olan hücrelerle (growing cell) elde edilen sonuçlara göre önemli derecede artmıştır. En iyi sonuç pH 5'te % 90 verim (alkol), % 90 ee ve % 3 keton olarak elde edilmiştir. Bu sonuç; üremekte olan hücrelerle biyotransformasyonda üst fazda hücre dışı enzim aktivitesinin verimleri düşürmekten sorumlu olduğunu doğrulamaktadır.

Üretildikten sonra kullanılan hücrelerle pH 5'te biyotransformasyon ortamı ölçek büyütülerek 200 mg substratla gerçekleştirilmiş ve % 82 verim % 98 ee elde edilmiştir. Üredikten sonra kullanılan hücrelerle gerçekleştirilen biyotransformasyonda kofaktör rejenerasyonu kısıtlı olduğundan üreyen hücrelerle biyotransformasyon ortamında yarışmalı prosesi inhibe etmek için araştırma yapılmıştır. Hücre üreme ortamındaki hücre dışı amidaz/proteaz bulunup ketonun amid bağlarını ayırdığı ya da amido alkolü daha polar olan amino alkole dönüştürüp organik fazdan alınamamasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bu yüzden biyotransformasyon proteaz inhibitörü olan PMSF (fenilmetilsülfonil florid) varlığında gerçekleştirilmiştir. Bu inhibitörün yarı ömrü yaklaşık 5 saat olduğundan tepkimeye günlük olarak eklenmesi gerekmektedir. İnhibitör varlığında biyotransformasyon sonucunda 5 gün sonunda amido alkol % 86, keton % 12 verimle (toplamda % 98 kazanımla) % 86 ee elde edilmiştir. PMSF yokken amidaz/proteaz seçimli olarak S-amido alkolü dönüştürdüğü ve bu yüzden derasemizasyonun hızlandığı düşünülmüştür. PMSF olduğu zaman yarışmalı enzim bastırılmış, derasemizasyonu yavaşlatmış (% ee azalmış) fakat toplam alkol ve keton verimini artırmıştır.

Voss vd. (2007) çalışmalarında yükseltgenme/indirgenmenin ardışık olarak gerçekleştiği, her iki basamakta da aynı katalizörün kullanıldığı yöntemle, bir sekonder alkolün (rasemik-2-dekanol) stereoinversiyonu ile biyokatalitik derasemizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemle (R)-alkolün tümü (S)-alkole dönüşmektedir. İlk basamakta hidrojen alıcı olarak aseton kullanılarak rasemik sekonder alkolün seçimli olmayan yükseltgenmesi, ikinci basamakta hidrojen verici olarak 2-propanol

kullanılarak oluşan ketonun stereoseçimli indirgenmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.31). Bu basamakları katalizlemek üzere çeşitli *Rhodococci* spp. türlerinin liyofilize hücreleri denenmiş ve ilk basamakta seçimsiz, ikinci basamakta stereoseçimli davranan *Rhodococcus* sp. CBS 717.73 en uygun biyokatalizör olarak bulunmuştur. Bu mikroorganizma ile yükseltgenme/indirgenmenin ardışık olarak aynı reaksiyon kabında gerçekleştirilmesi ile rasemik 2-dekanolden S-2-dekanol % 92 ee ve % 82 verim ile elde edilmiştir.

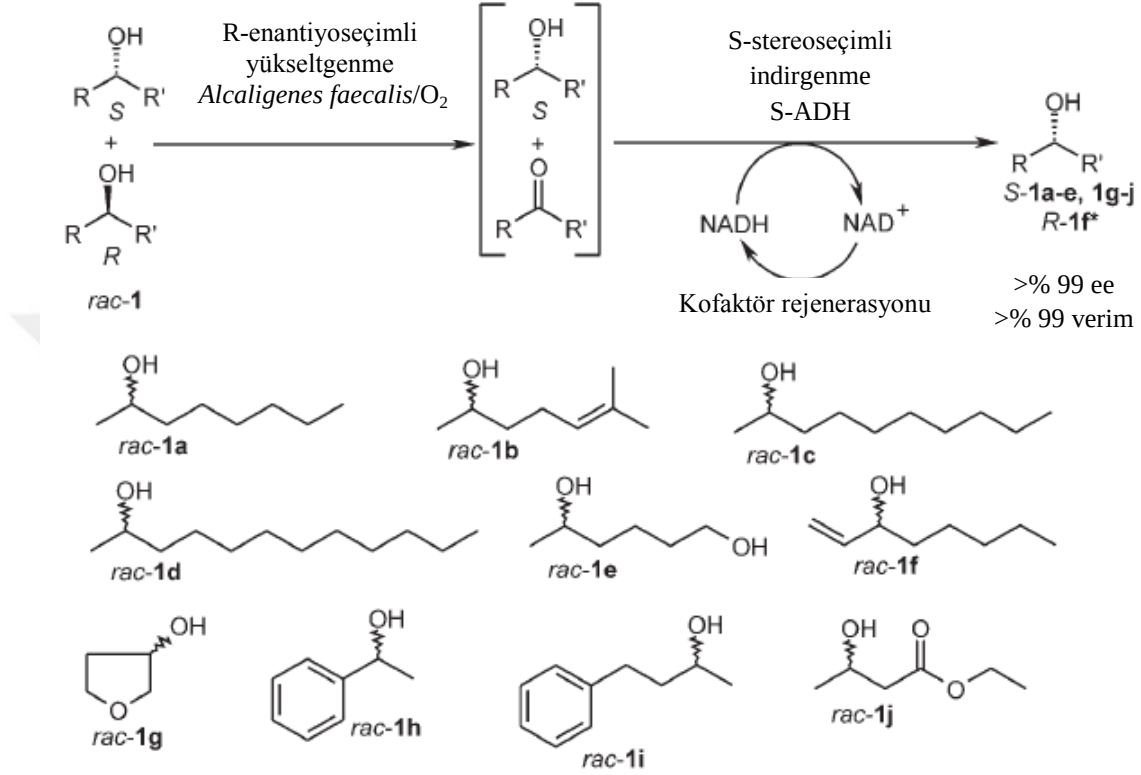


Şekil 2.31 Yükseltgenme/indirgenme ile iki basamakta derasemizasyon

Voss vd. (2008a) çalışmalarında farklı sekonder alkollerin eşanlı ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri ile derasemizasyonunu incelemişler, analizlerini GC'de gerçekleştirmişlerdir. İlk olarak sekonder alkollerin derasemizasyonunu tek bir tepkime kabında ticari olarak elde edilebilen mikroorganizmalarla incelemişler, *Alcaligenes faecalis* DSM 13975'in en yüksek yükseltgenme aktivitesine sahip olan mikroorganizma olduğuna karar vermişlerdir. Bu mikroorganizmanın liyofilize ve taze hücreleri ile rasemik 2-oktanolün R-enantiyomerinin enantiyoseçimli yükseltgenmesi ile optikçe saf S-2-oktanolün >% 99 ee ile elde edildiği görülmüştür (22 saat, 60 mM substrat derişimi).

Daha sonra farklı sekonder alkollerin derasemizasyonunu *Alcaligenes faecalis* DSM 13975 (R-seçimli yükseltgenme) ve ticari ADH enzimleri (S-seçimli indirgenme) ile gerçekleştirmiş (Şekil 2.32) ve 1-22 saat aralığında genellikle yüksek dönüşüm ve ee değerleri elde etmişlerdir. Kofaktör rejenerasyonu için farklı kosubstratlar denemişler ve

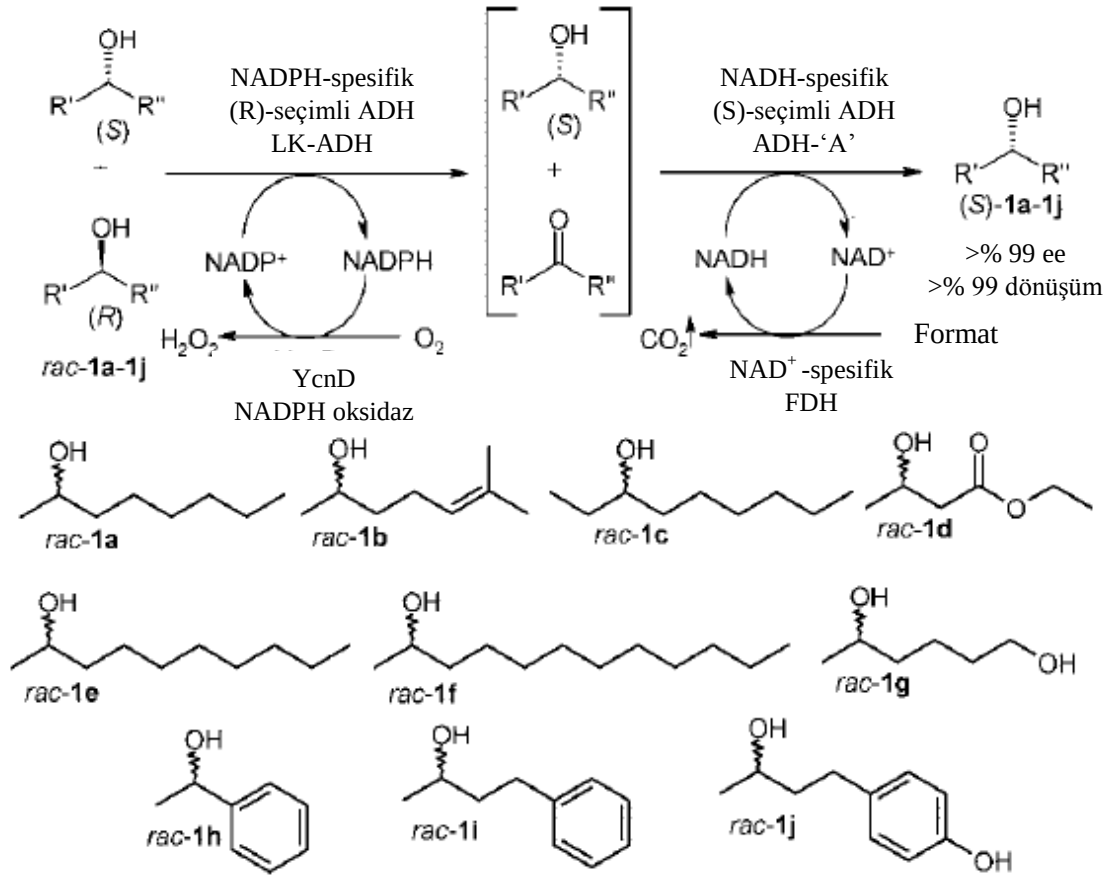
(±)-2-oktanol ve (±)-sulkatolden S-alkolün elde edilmesinde kosubstrat olarak glukoz kullandıklarında 4 saatte >% 99 ee, 2-propanol kullandıklarında 1 saatte % 93-96 ee değerlerini elde etmişlerdir.



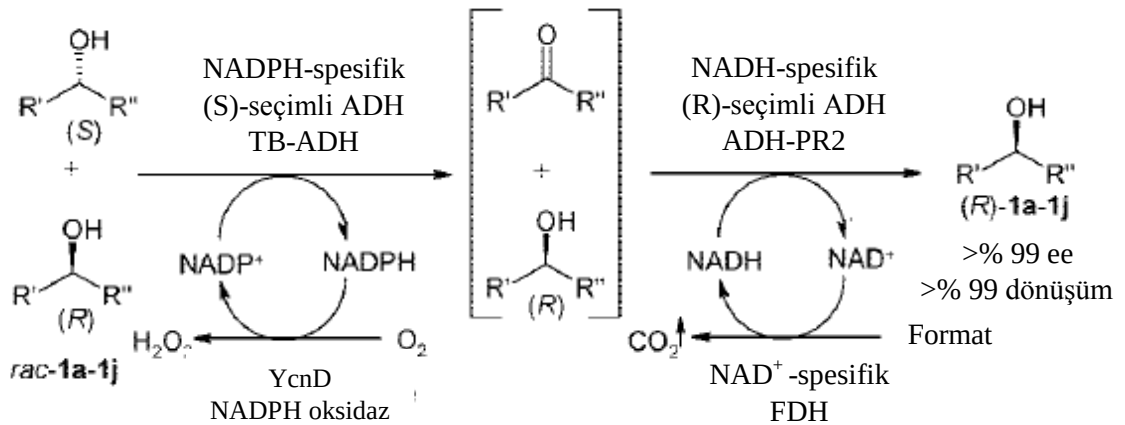
Şekil 2.32 Farklı sekonder alkollerin derasemizasyonu

Voss vd. (2008b) çalışmalarında farklı rasemik sekonder alkollerin eşanlı yükseltgenme-indirgenme döngüleri ile stereoinversiyonla derasemizasyonunu incelemişler, bunun için farklı mikroorganizmalardan elde edilen R ve S-seçimli ticari ADH'lar, ticari FDH (format dehidrojenaz) ve kendi ürettikleri YcnD'i (rekombinant protein) kullanmışlardır (Şekil 2.33).

Farklı rasemik alkollerden S-alkol ve R-alkolün >% 99 ee ve yüksek dönüşüm ile 3-24 saatte elde edildiği saptanmıştır. S-alkol elde etmek için şekil 2.33'deki tepkime sistemi, R-alkol elde etmek için de şekil 2.34'deki farklı ADH kaynaklarının ters sırayla kullanılmasını içeren tepkime sistemi kullanılmıştır.



Şekil 2.33 Farklı rasemik sekonder alkollerin eşanlı yükseltgenme-indirgenme döngüleri ile stereoinversiyonla derasemizasyonu ile S-alkol üretimi



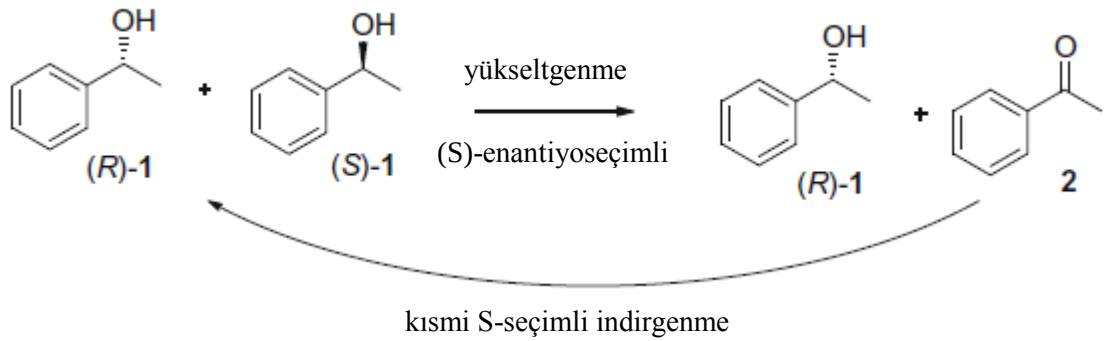
Şekil 2.34 Farklı rasemik sekonder alkollerin eşanlı yükseltgenme-indirgenme döngüleri ile stereoinversiyonla derasemizasyonu ile R-alkol üretimi

Kullanılan farklı sekonder alkollerden (±)-1-fenil etanol kullanıldığı zaman şekil

2.33'deki sisteme göre S-alkol % 90 verim, >% 99 ee ile 16 saatte elde edilmiştir.

Mantovani vd. (2009) çalışmasında *Candida albicans* CCT 0776 (tüm hücre) kullanılarak fenil etanolün derasemizasyonunu gerçekleştirerek R-enantiyomerini % 99 ee ve % 98 verimle elde etmişlerdir. Derasemizasyon tepkimesi ilk basamakta hızlı S-seçimli yükseltgenme (NADP ve O₂ bağlı) ve ikinci basamakta yavaş kısmi S-seçimli (R-seçimli) indirgeme (NADH bağlı) şeklinde gerçekleşmiştir. 1,2-fenil etanol kullanılarak stereoinversiyon mekanizması araştırılmıştır. Fenil etanolün (1) stereoinversiyon prosesinde biyotransformasyon tepkimesi GC-FID'de kiral durgun faz kolonu ile izlenmiştir. 2.5 saat reaksiyon süresinde rasemik karışım R-enantiyomerine dönüşmüştür (% 99 ee, % 48 dönüşüm). Daha uzun biyoreaksiyon süresinde (24 saat) R-enantiyomerini % 96 verimle elde etmeyi sağlamıştır.

Substrat olarak keton (2) kullanıldığında S-alkol düşük ee ile üretilmiştir. Bu alkol ketona (2) yüksek S-seçimli reaksiyon ile dönüşmüş, birkaç döngü sonra R-alkol yüksek ee ve verim ile elde edilmiştir (Şekil 2.35).



Şekil 2.35 Fenil etanolün (1) stereoinversiyonu

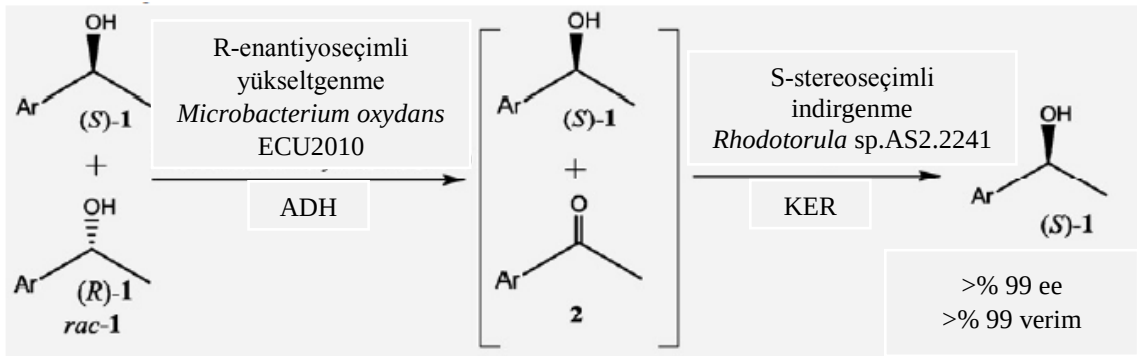
(±)-fenil etanolün R-fenil etanol'e stereoinversiyonu iki basamaklı proses olarak özetlenebilir:

- S-enantiyomerinin hızlı oksidasyonunu içerek kinetik rezolüsyonla ketonun (2) oluşumu (enantiyospesifik NADP⁺-bağlı enzim ile) ve tepkimeye girmeyen (R)-1'in kalması

- (2)'nin yavaş indirgenmesi (NADH-bağılı redüktaz) ile (R)-1 hemen hemen hiç enantiyoseçimli olarak oluşmamaktadır.

Ayrıca, aynı mikroorganizma ile farklı sekonder alkollerin stereoinversiyonu incelenmiştir. (R,S)-1-benziloksi-1,2-diolün derasemizasyonu ile S-enantiyomeri % 98 ee ve % 81 verimle üretilmiştir. (±)-2-nonandiol ve (±)-2-undekanolün derasemizasyonunda proses etkili olmamıştır.

Li vd. (2010) çalışmalarında rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonunu R-1-fenil etanolün S-1-fenil etanole stereoinversiyonu ile gerçekleştirmişlerdir. Aynı reaksiyon kabında alkol dehidrojenaz ve keton redüktaz (ters stereoseçimliliğe sahip) enzimleri içeren tüm hücre biyokatalizörleri ile enantiyoseçimli yükseltgenme ve stereoseçimli indirgenme aynı anda gerçekleşmektedir. *Microbacterium oxydans* ECU2010 R-sekonder alkolün ketona stereoseçimli oksidasyonunu katalizlerken *Rhodotorula* sp. AS2.2241 da ketonun S-sekonder alkole indirgenmesini katalizlemektedir (Şekil 2.36). Tüm hücre katalizörlerinin her biri hücre içi kofaktör rejenerasyon sistemine sahiptir ve bu yüzden pahalı kofaktör ve/veya kofaktör rejenerasyonu için oksidoredüktaz eklenmesine ihtiyaç olmamaktadır.



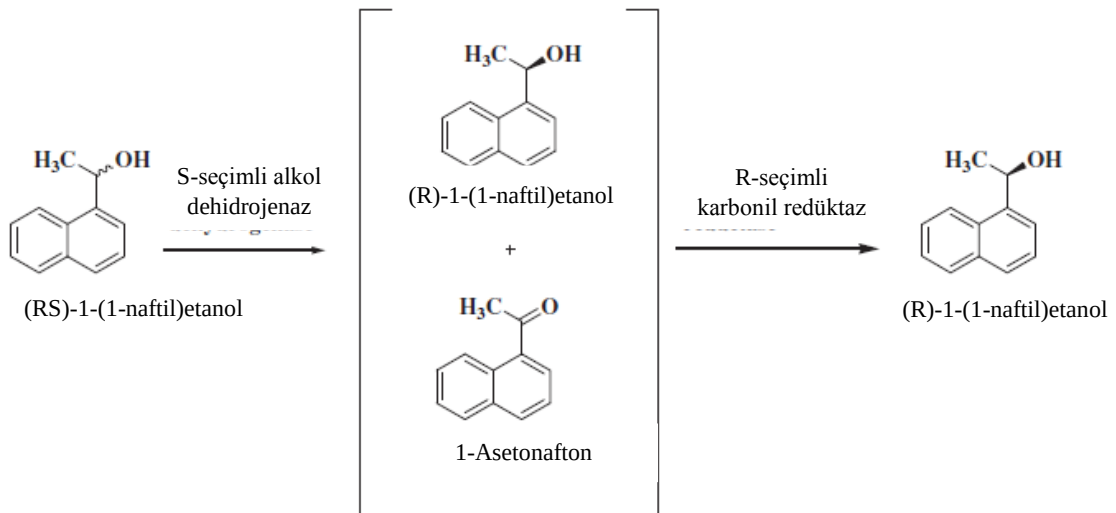
Şekil 2.36 Çift enzimli sistem ile derasemizasyon

Analizler GC'de kiral GC-kolonu ve HPLC'de kiral kolon (Chiralcel OD) kullanılarak yapılmıştır.

Stereoinvertiyon prosesi rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonunda R-1-fenil etanolün miktarı hızla azalmış (yükseltgenmeye bağı olarak) 8 saatte sıfıra düşmüştür. Bu sırada asetofenon oluşmuş ve S-1-fenil etanole dönüşmüştür. S-1-fenil etanolün miktarı 16 saate kadar artmış, 16-32 saat arası neredeyse değişmemiştir ve sonuçta S-1-fenil etanolün % 98.2 verim ve >% 99 ee ile elde edilmiştir.

Aynı zamanda geniş bir spektrumda rasemik aril sekonder alkoller ile deneyler yapılmış ve iki mikroorganizma ile S-enantiyomerine etkili bir şekilde derasemize olduğu ve optikçe saf sekonder alkollerin yüksek verim (% 86.5-99) ve yüksek optikçe saflıkta (>% 99) elde edildiği görülmüştür. Farklı aril sekonder alkollerin derasemizasyonunda para konumlu aromatik alkollerin yüksek ee ve verimle tepkimeye girdiği saptanmıştır.

Amrutkar vd. (2013) çalışmalarında bir sekonder alkol olan (R,S)-1-(1-naftil)etanolün, *Candida parapsilosis* MTCC 1965 mikroorganizması katalizörlüğünde stereoinvertiyonuyla R-1-(1-naftil) etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bu mikroorganizma sekonder alkollerin stereoinvertiyonu için gerekli redoks sistemine sahiptir. Böylece stereoinvertiyonda S-1-(1-naftil)etanol stereoseçimli olarak prokiral 1-asetonaftona yükseltgenmekte ve sonra 1-asetonafton da stereoseçimli olarak R-1-(1-naftil) etanole indirgenmektedir (Şekil 2.37).



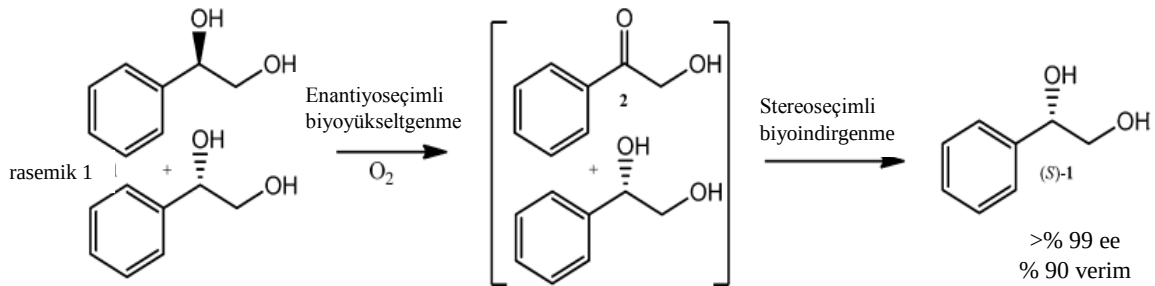
Şekil 2.37 (S)-1-(1-naftil)etanolün *Candida parapsilosis* hücreleri ile stereoinvertiyonu

Optimum tepkime koşullarını belirlemek için farklı koşullarda çalışılmıştır. Sıcaklık etkisi incelendiğinde (25-45 °C) % ee, sıcaklık 35 °C'a kadar arttığında değişmemiş fakat 35 °C'dan sonra aniden düşmüştür. Verim ise 30 °C'da % 87 iken sıcaklık arttığında düşmüştür. Bu nedenle 30 °C en uygun sıcaklık olarak belirlenmiştir. Tepkime, farklı zaman aralıklarında (0-12 saat) tepkime karışımı analizlenerek takip edilmiş, S-enantiyomerinin derişiminin azalışı ile R-enantiyomerinin arttığı gözlenmiştir. Stereoinversiyonun ilerleyişi ile ara ürün olan prokiral ketonun oluşumu da gözlenmiştir. 12 saatte en yüksek % ee ve en yüksek verim (R-1-(1-naftil) etanol) elde edilmiştir. Stereoinversiyon tepkimesine pH'n etkisi incelenmiş (pH 3-10), pH arttıkça % ee ve % verim önce artmış, pH 7 değerinde en yüksek değerlerine ulaşmış, daha sonra pH arttıkça % ee sabit kalırken % verim düşmüştür. pH 7'de en yüksek % 100 ee ve % 88 verim (R-1-(1-naftil)etanol) elde edilmiştir. Stereoinversiyona organik çözücü etkisi incelenmiş, tepkime ortamına substratın çözünürlüğünü artırmak için % 2 (v/v) oranında polar ve polar olmayan organik çözücüler (farklı log P değerlerinde) eklenmiştir. Suyla karışabilen çözücüler ile, kosolvent olarak çözünürlüğü artırması, suyla karışamayan çözücülerle de tepkime karışımının bifazik olması amaçlanmıştır. Denenen çözücüler içinden 1,4-dioksan, hekzan ve DMSO ile yüksek % ee elde edilmiştir. En yüksek % ee (>99) ve % verim (55.78) hekzanda elde edilmiştir. Çözücü paloritesi (log P) ve enzim aktivitesi arasında direk bir ilişki gözlenmemiştir. Diğer çözücüler olan toluen, piridin, 2-propanol ve etanolün enzimi deaktif etmiş olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak optimum koşullar olan 30 °C sıcaklıkta, 200 mg/mL hücre derişiminde, pH 7 fosfat tamponunda, 200 rpm karıştırma hızında, 12 saat tepkime süresinde R-1-(1-naftil)etanol % 88 verim ve % 100 ee ile elde edilmiştir.

Cazetta vd. (2014) çalışmalarında *Candida albicans* CCT 0776 mikroorganizmasını kullanarak stereoinversiyonla rasemik 1-fenil-1,2-etandiol ve türevlerinin derasemizasyonunu incelemişlerdir. Burada tek bir tepkime kabında iki basamaklı bir prosesle R-enantiyomerleri ketonları olan α -hidroksi asetofenonlara yükseltgenmiş, sonra da S-enantiyomerlerine indirgenerek % 60-85 verim ve % 99 ee ile S-enantiyomerleri elde edilmiştir. Böylece R-enantiyomerinin stereoinversiyonu ile enantiyoseçimli derasemizasyon gerçekleşmiştir. Proses, başka benzer 1,2-dioller ile aynı tepkime koşullarında gerçekleştirildiğinde başarılı olmamıştır. Bunun substratların

yapısal farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Rasemik 1-fenil-1,2-etandiolün *C. albicans* ile derasemizasyonunda 48 saat sonra S-1-fenil-1,2-etandiol % 80 verim ve % 99 ee ile elde edilmiştir. Tepkime argon ortamında gerçekleştirildiğinde ise yavaştır ve sadece kısmi derasemizasyon gerçekleşmiştir (7 günde bile oksijenli ortamdakinin neredeyse yarısı değerlere ulaşılabilmiştir). Oksijenli ortamda gerçekleşen tepkimenin GC analizlerinde 1-fenil-1,2-etandiolün ketonu olan α -hidroksi asetofenon gözlenmiştir. Bu da derasemizasyon prosesinin stereoinversiyonla gerçekleştiğini göstermektedir. Mikroorganizmada bulunan NADH gerektiren ADH ve NADH oksidaz enzimleri ile alkolün yükseltgenmesi, moleküler oksijenin fazlasıyla da NAD^+ rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Mekanizmayı doğrulamak için sadece R-enantiyomeriyle aynı tepkime koşullarında derasemizasyon gerçekleştirildiğinde ara ürün olan keton GC analizinde gözlenmiş ve 2 günlük tepkime süresinde S enantiyomerine indirgenip % 99 ee ile S-enantiyomeri elde edilmiştir. Sadece keton ile *C. albicans* mikroorganizması ile tepkime gerçekleştirildiğinde ise 22 saat sonra S-enantiyomeri % 86 verim ve % 99 ee ile elde edilmiştir. Tüm bu çalışmalara göre *C. albicans* ile rasemik 1-fenil-1,2-etandiolün aynı tepkime kabında iki basamaklı derasemizasyonu; R-enantiyomerinin R-seçimli bir alkol oksidaz enzimi ile yükseltgenmesiyle keton oluşumu ve sonra S-seçimli bir alkol dehidrojenaz enzimi ile indirgenmesiyle S-enantiyomerinin oluşumu ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.38). Bu proses için gerekli kofaktör rejenerasyonları hücrenin içinde bulunan enzimatik araçlarla gerçekleşmiştir.



Şekil 2.38 *C. albicans* hücreleri kullanılarak stereoinversiyonla 1-fenil-1,2-etandiolün derasemizasyonu için önerilen mekanizma

Palmeira vd. (2014) çalışmasında *Arthrobacter* sp. mikroorganizması ile aerobik R-seçimli derasemizasyon ve anaerobik S-seçimli indirgenmenin gerçekleştiği bir reaksiyon sistemi incelenmiştir. Buna göre, ilk olarak rasemik 1-(4-metil fenil)etanolün aerobik ve anaerobik koşullarda farklı tepkime sürelerinde yükseltgenmesi incelenmiştir. Aerobik koşullarda (hava) tepkime süresi arttıkça (3-120 saat) alkol derişimi artmıştır. 120 saat sonra R-alkolün derişimi % 94'lere çıkmış ve % 94 ee ile elde edilerek neredeyse mükemmel bir derasemizasyon prosesi başarılmıştır. Aynı tepkime anaerobik koşullar altında (N_2) yapılırken yükseltgenme neredeyse hiç gerçekleşmemiş, % ee=2 ve keton derişimi de % 4'ler kadar düşük bulunmuştur. Aynı tepkime aerobik koşullarda, O_2 ortamında gerçekleştirildiğinde, 3 saat sonra keton % 46 oranında, % ee=96(R) elde edilirken hava ortamında gerçekleştirildiğinde 3 saat sonra keton % 44 oranında, % ee=% 94 (R) elde edilmiştir. Buna göre tepkimenin O_2 ya da hava ortamında gerçekleşmesinin önemli bir fark yaratmadığı gözlemlendiğinden alkolün yükseltgenme tepkimesinin tampon çözeltisinde doğal oksijen varlığında gerçekleşmesinin yeterli olduğu anlaşılmıştır.

Bir de 4-metil-asetofenonun (oluşan keton) *Arthrobacter* sp. ile aerobik ve anaerobik koşullarda indirgenmesi araştırılmıştır. İlginç bir şekilde tepkime sadece oksijensiz ortamda yüksek enantiyoseçimlilikte gerçekleşmiştir. Tepkimenin 3 saat sonrasında N_2 ortamında ketonun indirgenmesiyle % 58 oranında alkol, >% 99 ee(S) ile elde edilmiştir. O_2 ve hava ortamında ise ürünün (S-enantiyomer) % ee'si >99 olmasına rağmen dönüşüm düşüktür. Bu mikroorganizma ile gerçekleştirilen tepkime türüne göre O_2 'nin varlığı ya da yokluğu önem taşımaktadır. Enantiyoseçimli yükseltgenme tepkimesini katalizleyen oksidoredüktaz için moleküler oksijen gerekli iken enantiyoseçimli indirgenmeyi katalizleyen oksidoredüktaz için gerekli değildir. Bunun için bu tepkime sisteminde, ilgili tepkimede gaz bileşimi değiştirildiğinde enantiyoseçimli bir dönüşüm gerçekleştirilebilir.

Karume vd. (2016) çalışmalarında sekonder alkollerin derasemizasyonunu tek enzim ortamında iki basamaklı olarak gerçekleştirmişlerdir. Bunun için sekonder alkol dehidrojenaz kaynağı olarak *Thermoanaerobacter ethanolicus* mutantını (TeSADH) kullanarak stereoseçimli olmayan yükseltgenme tepkimesiyle rasemik alkolün ketona

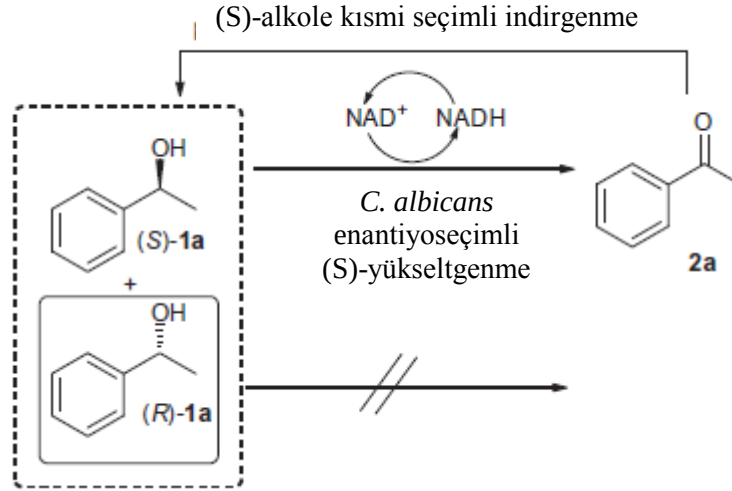
dönüşümünü, sonra da stereoseçimli indirgenme ile de ketonun alkole dönüşümü prosesini gerçekleştirmişlerdir. Bu proste kosubstrat olarak aseton ve 2-propanol oranlarının yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinin stereoseçimliliğine etkisini araştırmışlardır.

TeSADH NADP^+ gerektiren bir ADH enzimidir. Termal kararlılığa ve organik ortama karşı toleransa sahiptir. Bu enzimi içeren, yaygın substrat seçimliliği ve stereoseçimliliğe sahip farklı mutantlar farklı sekonder alkollerle birlikte kullanılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu mutantlardan W110G TeSADH kullanılarak rasemik 4-fenil-2-bütanolün stereoseçimli olmayan yükseltgenme tepkimesinde kosubstrat olarak farklı derişimlerde (% 1-10 v/v) aseton kullanılmıştır. Aseton oranı arttıkça E değerinin (enantiyomerik oran) arttığı fakat oran % 3 (v/v)'nin üzerine çıkınca enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir. Buradan asetonun yüksek derişimlerde TeSADH enzimine inhibitör etkisi yaptığı anlaşılmıştır. Yüksek dönüşüm, düşük stereoseçimlilik gözlenen % 3 (v/v) aseton oranının bu derasemizasyon prosesi için uygun değer olduğuna karar verilmiştir. En iyi stereoseçimli indirgenme tepkime koşullarına karar vermek için 4-fenil-2-bütanonun indirgenme tepkimesinde 2-propanolün derişiminin etkisi incelenmiştir (% 1-30 v/v). Bunun sonucunda 2-propanol derişimi % 20 (v/v)'den yüksek olduğunda yüksek dönüşüm ve % ee elde edilmiş, fakat % 30 (v/v)'den yüksek olduğunda dönüşümün düştüğü gözlenmiştir. Bu nedenle optimum 2-propanol derişimi % 30 (v/v) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada derasemizasyon prosesinde tek enzim kullanımı önceki çalışmalara göre önemli bir gelişmedir. Sonuçta, saflaştırılmış tek mutant enzim kullanarak tek tepkime kabında ara ürün olan prokiral ketonu ayırmaya ihtiyaç olmaksızın >% 99 ee ve >% 99.5 verimle sekonder alkollerin derasemizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Nasario vd. (2016) çalışmalarında sekonder alkol olan 1-aril etanollerin oksidatif kinetik rezolüsyonunu ve bunlardan biri olan l-fenil etanolün derasemizasyonunu katalizlemek için *Candida albicans* CCT 0776 mikroorganizmasını kullanmışlardır. *C. albicans* mayasını kullanarak oksidatif kinetik rezolüsyonla R-l-aril etanoller ve diğer sekonder alkoller yüksek % ee (>90) ile elde etmişlerdir.

1-fenil etanolün *C. albicans* mayası katalizörlüğünde derasemizasyon prosesini, her basamağı ayrı inceleyerek aydınlatmışlardır. Rasemik 1-fenil etanolü kullanarak, reaksiyonu derasemizasyon döngüleriyle gerçekleştirip 6 gün sonunda R-1 fenil etanolü % 89 verim ve % 98 ee ile elde etmişlerdir. Mekanizmayı aydınlatmak için bir de asetofenonun indirgenmesini incelemişlerdir. Buna göre asetofenon ilk başta S-seçimli indirgenmiş, 1 saat sonra % 61 S-1-fenil etanol % 95 ee ile elde edilmiş daha sonra % ee hızla azalmış 24 saat sonra 1 fenil etanol rasemik olarak elde edilmiştir. 120 saat sonra ise R-1 fenil etanol % 92 verim ve % 92 ee ile elde edilmiştir. R-1-fenil etanol, asetofenonun indirgenmesi sırasında reaksiyon ortamında değişmeden kalmış, S-1-fenil etanol yükseltgenerek geri asetofenona dönüşmüştür. Böylece birkaç döngü sonra R-seçimli indirgenme, S-seçimli yükseltgenme ile R-1 fenil etanol derişimi artmıştır.

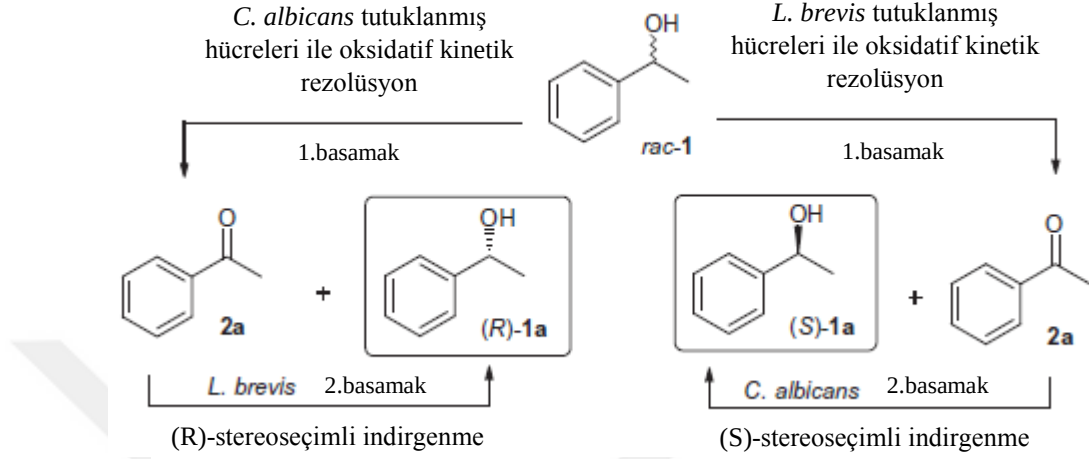
Mekanizmayı aydınlatabilmek için bir de 1-fenil etanolün her iki enantiyomeri ile ayrı olarak aynı biyokatalitik tepkime gerçekleştirilmiştir. S-1-fenil etanol ile *C. albicans* mikroorganizması katalizörlüğünde tepkime gerçekleştirildiğinde S-1 fenil etanol önce hızla asetofenona yükseltgenmiş, sonra R-1 fenil etanole indirgenmiştir. Buna göre S-1-fenil etanolün enantiyoseçimli yükseltgenmesi ve asetofenonun R seçimli indirgenmesinin birkaç döngü sonrasında (tepkimenin 15. gününden sonra) R-1-fenil etanol % 92 ee ile elde edilmiştir. R-1-fenil etanolün *C. albicans* mikroorganizması ile 15 günlük tepkimesi sonucu ise, hiç dönüşmediği gözlenmiştir. Buna göre rasemik 1-fenil etanolün *C. albicans* mikroorganizması katalizörlüğünde derasemizasyonu şekil 2.39'daki gibi önerilmiş ve döngülü derasemizasyon ile R-1-fenil etanol yüksek verimle elde edilmiştir. Çünkü R-1-fenil etanol tepkimeye girmemekte ve birkaç yükseltgenme/indirgenme döngüsünden sonra birikmektedir. Bu şekilde rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonu gerçekleşmekte ve R-1-fenil etanol yüksek ee ile elde edilmektedir. Fakat bunun için tepkime süresi uzun olduğundan prosesin daha hızlı yürümesi için *C. albicans* ile ters seçimliliğe sahip ADH enzimi içeren *Lactobacillus brevis* CCT3745 mikroorganizması ile kombine oksidadif kinetik rezolüsyon yapılmıştır. *L. brevis* asetofenonu indirgeyerek 24 saat sonra % 90 verim ve % 99 ee ile R-1-fenil etanolün elde edilmesini sağlamıştır.



Şekil 2.39 *C. albicans* hücreleri (resting cell) ile rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonu için önerilen mekanizma

Daha sonra, rasemik 1-fenil etanolün stereoinversiyonla derasemizasyonunu *C. albicans* ve sonrasında *L. brevis* mikroorganizmalarını ardışık proses olarak kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Tutuklanmış *C. albicans*'tan sonra serbest *L. brevis* hücreleri ile rasemik 1 fenil etanolden R-1-fenil etanol üretilmiştir. Bunun için yükseltgenmede (ilk aşama) NAD^+ kofaktör rejenerasyonuna ihtiyaç olduğundan aseton eklenmiş, indirgenme (ikinci aşama) için NADH rejenerasyonu gerektiğinden 2-propanol eklenmiştir. Bu koşullarda rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonu 17 saatte % 99 ee (R-1-fenil etanol) ve tam dönüşümle sonuçlanmıştır. Tutuklanmış *C. albicans* mikroorganizması ve rasemik 1 fenil etanol ilk aşamada kullanılıp ikinci aşamada serbest *L. brevis* hücreleri kullanıldığında R-1-fenil etanol % 85 dönüşüm (% 50 verim) ve % 80 ee ile elde edilmiştir. Mikroorganizmalar ters sırayla kullanıldığında (tutuklanmış *L. brevis* mikroorganizması ilk basamakta, *C. albicans* serbest hücreleri ikinci aşamada) S-1-fenil etanol % 75 verim ve % 80 ee ile elde edilmiştir (Şekil 2.40). İlk basamakta tutuklanmış hücre kullanılması (*L. brevis* ya da *C. albicans*) rasemik 1-fenil etanolün 4 kez oksidatif kinetik rezolüsyonunda tutuklanmış hücrelerin aktivite kaybı olmadan tekrar kullanılması ve kolay ürün ekstraksiyonu sağlaması açısından avantajlı olmuştur. Sonuç olarak, *C. albicans* ve *L. brevis* mikroorganizmaları ayrı ve sırayla kullanılarak stereoinversiyon ile derasemizasyon yapıldığında rasemik 1-fenil etanolün her iki enantiyomeri etkili, iyi verim ve yüksek ee ile elde edilmiştir. R ya da S enantiyomerinin üretilmesi ardışık proste mikroorganizmaların sıralamasına bağlı

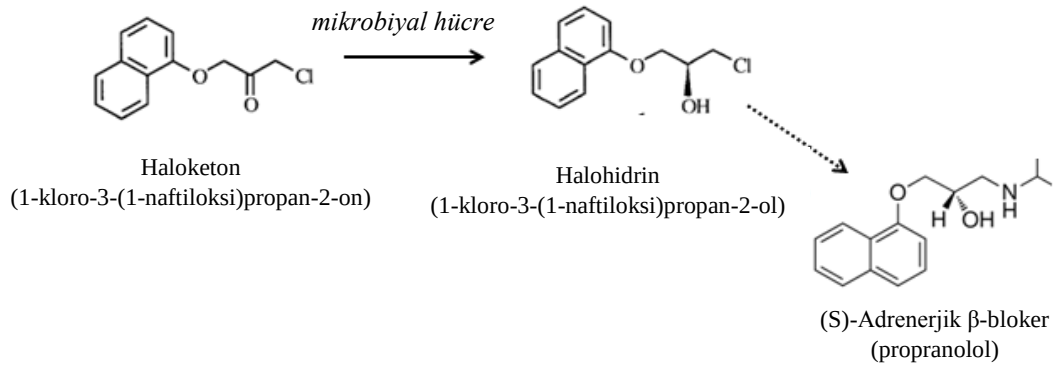
olarak değişmiştir. İlk basamakta aljinat taneciklerine tutuklanmış hücrelerin kullanılması mikroorganizmanın ortamdan uzaklaştırılıp ikinci mikroorganizmanın eklenmesini kolaylaştırmıştır.



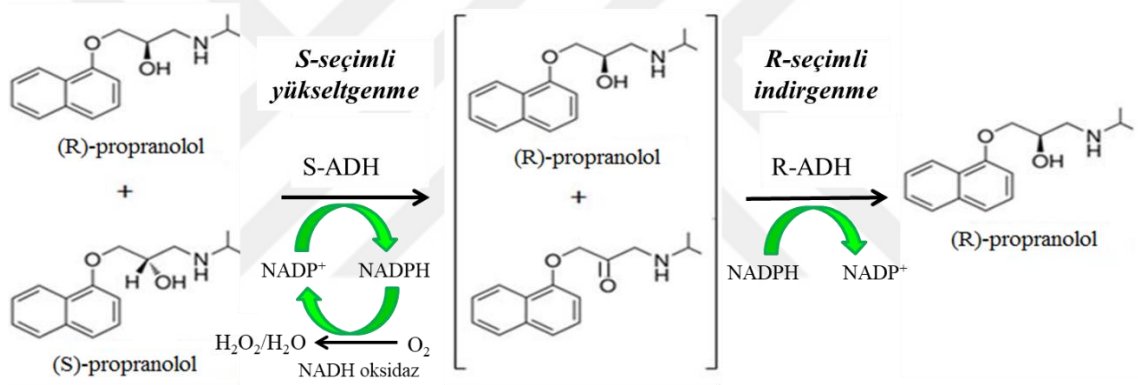
Şekil 2.40 Her iki enantiyomeri ayrı olarak elde etmek için *C. albicans* ve *L. brevis*'in ardışık olarak kullanılmasıyla rasemik 1-fenil etanolün derasemizasyonu

Yapılan çalışmada; farmasötik açıdan önem taşıyan β -blokerlardan biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi için haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün çıkış maddesi olan halohidrinlerin üretimi (Şekil 2.41) ve rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi (Şekil 2.42) olmak üzere iki yöntem incelenmiştir. Bu yöntemlerden haloketonların mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün çıkış maddesi olan halohidrinlerin üretimi tüm uğraşlara rağmen haloketonun sentezinin yapılamamasından dolayı gerçekleştirilememiştir. Bu incelemeden sonra çalışmalara başarılı olunan yöntem olan rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi konusunda devam edilmiştir. Çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak tepkimeyi katalizleyecek uygun mikroorganizma araştırılmış ve *R. oryzae* CBS111718 uygun mikroorganizma olarak belirlenmiştir. Tüm hücre katalizörleri hücre içi kofaktör rejenerasyon sistemine sahiptir ve bu yüzden pahalı kofaktör ve/veya kofaktör rejenerasyonu için oksidoredüktaz eklenmesine ihtiyaç olmamıştır. Tepkimenin yüksek ee ve verimle gerçekleşmesi için öncelikle tepkimeye etki eden parametreler belirlenmiş, daha sonra da proses koşullarının optimizasyonu Plackett

Burman ve Cevap Yüzey Yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.41 Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün çıkış maddesi olan halohidrinlerin üretimi



Şekil 2.42 Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich, Merck, Fluka ve Riedel-de Haën'den temin edilmiştir. Analizlerde kullanılan hekzan ve etanol HPLC saflığında olup bu çözücüler için Sigma-Aldrich ve Merck markası tercih edilmiştir.

Bu çalışmada farmasötik açıdan önem taşıyan β -blokerlardan biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi için;

- Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi
 - Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu
- olmak üzere iki yöntem incelenmiştir. Bu iki yöntemle ilişkili uygulanan deneysel yöntemler sırasıyla verilmiştir.

3.1 Haloketonların Seçimli Mikrobiyal İndirgenmesi ile Propranololün Öncü Maddesi Olan Halohidrinlerin Üretimi

Seçimli mikrobiyal indirgenme ile halohidrinlerin (propranololün öncü maddesi) üretimi tepkimesinde substrat olarak kullanılacak olan haloketon kimyasal olarak sentezlenmeye çalışılmıştır (Martinez vd. 2000). Bunun için ilk olarak haloketonun sentezinde gerekli olan halohidrinin kimyasal sentezi gerçekleştirilmiştir. Kimyasal olarak sentezlenen halohidrin rasemik karışım halindedir.

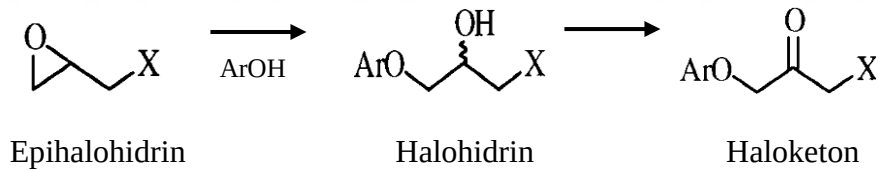
3.1.1 Halohidrin sentezi

Çalışmada, ilk olarak rasemik epihalohidrinlerin uygun fenollerle o-alkillenmesi yöntemi ile halohidrin eldesi üzerine çalışılmıştır. Halohidrinin (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol) kimyasal sentezi için aşağıdaki aşamalar adım adım gerçekleştirilmiştir (Martinez vd. 2000):

1. 0.02 mol α -naftol, 0.1 mol epiklorohidrin, 0.002 mol piridin cam balon içerisinde oda sıcaklığında 24 saat karıştırılarak tepkime gerçekleştirilmiştir.
2. Tepkimeye girmeyen epiklorohidrin ve piridin vakumda uzaklaştırılmıştır.
3. Karışım soğutulup 10 mL kloroform ve 5 mL % 35'lik HCl eklenmiştir.
4. Elde edilen karışım oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır.
5. 10 mL su eklendikten sonra ekstraksiyon ile safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 2 defa yapılmıştır.
6. Organik fazın içinde kalan su, susuz CaCl_2 ile tutulmuş ve organik faz vakumda deriştirilmiştir.

3.1.2 Haloketon sentezi

Haloketonlar ise, rasemik epihalohidrinlerin uygun fenollerle *o*-alkillenmesi sonucu oluşan halohidrinlerin oksidasyonu ile elde edilirler (Martinez vd. 2000). Rasemik epihalohidrinlerden haloketonların eldesinin tepkimeleri şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Rasemik epihalohidrinlerden haloketonların eldesi

Bu çalışmada haloketon (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-on), “Halohidrin sentezi” bölümünde anlatılan yöntemle sentezlenen alkolün (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol) “Swern Yükseltgenmesi” ile, aşağıdaki adımlar gerçekleştirilerek elde edilmeye çalışılmıştır (Martinez vd. 2000):

1. 10 mL diklorometan içindeki 4.6 mmol okzalil klorür, aseton-kuru buz banyosu yardımıyla -70 °C'ye soğutulmuştur.
2. 3 mL diklorometan içindeki 9.2 mmol dimetil sülfoksit (yükseltgen) 5 dakika içinde karışıma eklenmiştir.

3. Reaksiyon karışımı aynı sıcaklıkta 10 dakika daha karıştırılmıştır.
4. 5 mL diklorometan içindeki alkol 4.2 mmol (halohidrin) 5 dakika içinde reaksiyon karışımına eklenmiştir.
5. Karışım 15 dakika daha karıştırıldıktan sonra üzerine 0.3 mL trietilamin eklenmiş ve soğutma banyosu kaldırılmıştır.
6. Karışıma oda sıcaklığında 10 mL su eklenmiştir.
7. Karışım diklorometan ile ekstrakte edilerek organik faz sulu fazdan ayrılmıştır. Sulu faz 3 kez 25 mL diklorometan ile ekstrakte edilmiştir.
8. Organik fazda kalan su, susuz CaCl_2 ile uzaklaştırılmıştır.
9. Organik faz vakumda deriştirilmiştir.

3.1.3 Halohidrin ve haloketonun NMR analizi

Sentezlenen halohidrin (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol) ve haloketon (1-kloro-3-(1-naftiloksi) propan-2-on) numunelerinin ^{13}C NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) analizleri, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi'nde ve ^1H NMR analizleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.4 Halohidrin ve haloketonun HPLC analizi

Halohidrin (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol) ve haloketonun (1-kloro-3-(1-naftiloksi) propan-2-on) HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) analizleri çizelge 3.1'de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir (Martinez Lagos vd. 2002).

Çizelge 3.1 HPLC analiz koşulları

HPLC	Kolon	Hareketli faz	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	UV Dedektör Dalga Boyu
Thermo Finnigan Spectra System	Chiralcel OD (4.6 x 250 mm)	hekzan/ izopropanol/ dietilamin (70/30/0.1)	0.5 ml/dk	10 μL	254 nm

3.1.5 Halohidrin ve haloketonun FTIR analizi

Halohidrin (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol) ve haloketonun (1-kloro-3-(1-naftiloksi) propan-2-on) FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) analizleri Kimya Mühendisliği Bölümü, Süperkritik Akışkan Teknolojisi Laboratuvarı'nda bulunan Shimadzu FTIR-8040 Spektrofotometre cihazında gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında elde edilmiştir.

3.1.6 *Pichia mexicana* CECT 11015 üreme koşulları

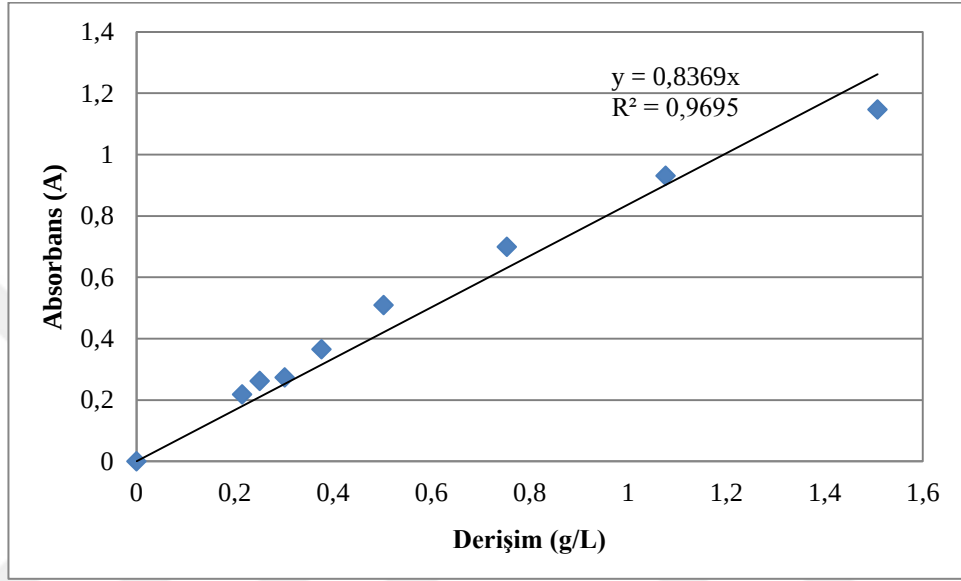
Haloketonun indirgenmesinde kullanılacak *Pichia mexicana* mikroorganizması 'Spanish Type Culture Collection (CECT)'dan alınmıştır. *P. mexicana* çizelge 3.2'de verilen üreme ortamında, 26 °C'de sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollü orbital çalkalayıcılarda çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.2 *Pichia mexicana* (CECT 11015) için üreme ortamı bileşimi

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glikoz	10
Pepton	5
Maya özütü	3
Malt özütü	3
Agar (katı ortam için)	20

Hücre üreme eğrisini oluşturabilmek için 100 mL sıvı üreme ortamına ekim yapılmış; zamanla ortamdan örnek alınıp UV Spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) $\lambda=400$ nm'de absorbans ölçümü yapılarak hücrenin üremesi takip edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda 100 mL'lik başka bir üreme ortamında 24 saat üretilen hücrelerden yararlanılarak yaş ve kuru hücre ağırlıkları belirlenmiştir. Yaş hücre ağırlığının bulunması için sıvı üreme ortamında çoğaltılan hücre santrifüjlenerek (Santrifüj cihazı: Hettich Rotina 35 R) tartılmıştır. Kuru hücre ağırlığının bulunması için ise bu yaş hücre 80 °C'de sabit tartıma gelene kadar takip edilmiştir. Bunun sonucunda, yaş hücre

(g)/kuru hücre (g) oranı 5.5 olarak bulunmuştur. Yaş hücre derişiminden yararlanılarak farklı seyreltme oranları için hesaplanan derişim değerlerine karşı alınan absorbans verileri kullanılarak kalibrasyon grafiğı (yaş hücre derişimine göre) oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Kuru hücre derişimine göre oluşturulan kalibrasyon grafiğı ise EK 1’de verilmiştir.



Şekil 3.2 *Pichia mexicana* yaş hücre derişimine göre kalibrasyon grafiğı

3.2 Rasemik Propranololün Biyokatalitik Derasemizasyonu

3.2.1 Kullanılan mikroorganizmaların üreme koşulları

3.2.1.1 *Lactobacillus kefir* NRRL B-1839

Lactobacillus kefir NRRL B-1839 ‘Northern Regional Research Laboratory (Agricultural Research Service Culture Collection)’den temin edilmiştir. *L. kefir* çizelge 3.3’te bileşimi verilen üreme ortamında, 35 °C, 150 rpm’de sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollü orbital çalkalayıcılarda çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.3 *L. kefir* için üreme ortamı bileşimi

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glikoz	22
Kazein pepton	10
Sodyum asetat	5
Maya özütü	5
Et özütü	10
K ₂ HPO ₄	2
Tween 80	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .H ₂ O	0.05

3.2.1.2 *Rhizopus oryzae* CBS 111718

Rhizopus oryzae CBS 111718 ‘Centraalbureau voor Schimmelcultures Culture Collection’ dan satın alınmıştır.

3.2.1.2.1 Katı üreme ortamı

R. oryzae (CBS 111718) mikroorganizması için glikozlu katı üreme ortamının bileşimi çizelge 3.4’te verilmiştir. Bu bileşimdeki üreme ortamına ekimi yapılan mikroorganizma 30°C’de, 4-7 gün süresince çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.4 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) için glikozlu malt ekstrakt agar (MEA) ortamı

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glikoz	20
Malt Özütü	20
Agar	20
Pepton	1

Glikozsuz katı üreme ortamının bileşimi ise çizelge 3.5’te verilmiştir. Bu ortama ekimi yapılan mikroorganizma ise 21°C’de, 7-10 gün süresince çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.5 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) için glikozsuz malt ekstrakt agar (MEA) ortamı

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Malt Özütü	30
Agar	15
Pepton (from soymeal)	3

3.2.1.2.2 Spor çözeltisi hazırlanması

Katı üreme ortamında çoğaltılan sporlar steril ortamda, öze yardımıyla bir miktar steril suya aktararak spor çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti iyice karıştırıldıktan sonra örnek alınmıştır. Alınan örnekten bir damla, Thoma lamına damlatılmıştır. Mikroskopta (Olympus CHK 2-F-GS) spor sayımı yapılarak başlangıç spor sayısı 5×10^5 olacak şekilde sıvı üreme ortamına ekim yapılmıştır.

3.2.1.2.3 Sıvı üreme ortamı

Sıvı üreme ortamını oluşturan maddeler ve derişimleri çizelge 3.6'da verilmiştir. Mikroskopta sayımı yapılan spor çözeltisinden olması gereken başlangıç spor sayısını elde etmek için hesaplanan miktarda, üreme ortamına aktarım yapılmıştır. Üretim; 30 °C'de, 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda, 2 günde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6 *Rhizopus oryzae* (CBS 111718) için sıvı üreme ortamı

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glikoz	20
Maya Özütü	5
Sodyum Klorür	5
Tripton	10

Ayrıca, *R. oryzae* mikroorganizması bir de çizelge 3.7'de bileşimi verilen PDB ortamında üretilmiştir. Diğer üreme ortamında izlenen yol ile aynı şekilde, üreme

ortamına aktarım yapılmıştır. Üretim; 30 °C’de, 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda, 2 günde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7 *Rhizopus oryzae* için sıvı üreme ortamı (PDB)

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glikoz	20
Patates ekstraktı	4

3.2.1.3 *Rhizopus arrhizus*

Rhizopus arrhizus mikroorganizması Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden temin edilmiştir.

3.2.1.3.1 Katı üreme ortamı

R. arrhizus mikroorganizması, PDA katı üreme ortamında, 30 °C’de, 4 gün süresince çoğaltılmıştır.

3.2.1.3.2 Spor çözeltisi hazırlanması

Bölüm 3.2.1.2.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.1.3.3 Sıvı üreme ortamı

Rhizopus arrhizus mikroorganizması öncelikle PDB sıvı üreme ortamında üretilmiştir. PDB ortamını oluşturan maddeler ve derişimleri çizelge 3.7’de verilmişti. Mikroskopta sayımı yapılan spor çözeltisinden olması gereken başlangıç spor sayısını elde etmek için hesaplanan miktarda, üreme ortamına aktarım yapılmıştır. Üretim; 30 °C’de, 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda, 2 günde gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca, *R.arrhizus* mikroorganizması bir de çizelge 3.8’de bileşimi verilen üreme ortamında 30 °C’de, 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda, 2 günde üretilerek tepkimede kullanılmıştır.

Çizelge 3.8 *Rhizopus arrhizus* için sıvı üreme ortamı (Damle vd. 2000)

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
D-Glikoz	50
Pepton	10
Soya unu	3

3.2.1.4 *Rhodotorula glutinis* DSM 70398

Rhodotorula glutinis, çizelge 3.9’da bileşimi verilen UYM ortamında, 30°C’de, 2 gün süreyle çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.9 UYM ortam bileşimi

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glikoz	10
Pepton	5
Maya Özütü	3
Malt Özütü	3

3.2.1.5 *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis mikroorganizması Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden temin edilmiştir. MRS üreme ortamında, 30°C’de, 3 gün süresince çoğaltılmıştır.

3.2.1.6 *Rhizopus arrhizus* NCIM 997

Rhizopus arrhizus NCIM 997 mikroorganizması National Collection of Industrial Microorganisms (NCIM) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2.1.6.1 Katı üreme ortamı

Rhizopus arrhizus mikroorganizması, taze patateslerden hazırlanan PDA katı üreme ortamında, 28°C’de çoğaltılmıştır.

3.2.1.6.2 Spor çözeltisi hazırlanması

Bölüm 3.2.1.2.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.1.6.3 Sıvı üreme ortamı

Mikroskopta sayımı yapılan spor çözeltisinden olması gereken başlangıç spor sayısını elde etmek için hesaplanan miktarda, çizelge 3.10’da bileşimi verilen üreme ortamına aktarım yapılmıştır. *R.arrhizus* mikroorganizması üreme ortamında 28 °C’de, 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcıda, 2 günde üretilerek tepkimede kullanılmıştır.

Çizelge 3.10 *Rhizopus arrhizus* için sıvı üreme ortamı (Damle vd. 2000)

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
D-Glikoz	50
Pepton	10
Soya unu	3

Ayrıca, *R. arrhizus* taze patateslerden hazırlanan patates dekstrozu sıvı üreme ortamında 28°C ve 150 rpm’de, 2 gün süreyle üretilerek de tepkimede kullanılmıştır.

3.2.1.7 *Geotrichum candidum* NCIM 980

Geotrichum candidum NCIM 980 mikroorganizması National Collection of Industrial Microorganisms (NCIM) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2.1.7.1 Katı üreme ortamı

Geotrichum candidum, taze patateslerden hazırlanan PDA katı üreme ortamında, 28°C’de çoğaltılmıştır.

3.2.1.7.2 Sıvı üreme ortamı

Geotrichum candidum, çizelge 3.11’de bileşimi verilen üreme ortamında, 28°C ve 150 rpm’de, 2 gün süreyle çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.11 *Geotrichum candidum* için sıvı üreme ortamı (Damle vd. 2000)

Bileşen	Derişim, g L ⁻¹
Glikoz	50
Pepton	10
Maya Özütü	10

Geotrichum candidum, bir de taze patateslerden hazırlanan patates dekstrozu sıvı üreme ortamında 28°C’de, 2 gün süreyle üretilerek tepkimede kullanılmıştır.

3.2.2 Hücrelere parçalama yöntemlerinin uygulanması

Mikroorganizmalar tepkimede kullanılmadan önce parçalanarak, hücre içi olduğu bilinen ADH ve NADH oksidaz enzimlerinin kullanıldığı biyotransformasyon tepkimesi için iç kütle aktarım kısıtlamalarını azaltmak amacıyla hücrelere ses ötesi dalga (SÖD),

mekanik parçalama yöntemleri uygulanmıştır. Bir de karşılaştırma amacıyla, hücreler plastik spatülle kabaca parçalanarak tepkimede kullanılmıştır.

3.2.2.1 Ses ötesi dalga (SÖD) uygulama yöntemi

Üreyen hücreler 6000 rpm, 4 °C, 20 dk santrifüjlendikten sonra üreme ortamı/tampon ortamı ile % 5-15 (w/v) oranında çözeltisi hazırlanmıştır. 40 W güçteki 20 kHz SÖD (Bandelin Sonoplus UW 3400, 19 mm prob çapı), 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 2-10 dk hücrelere uygulanmıştır. SÖD uygulanırken mikroorganizmanın bulunduğu beher, uygulama sırasında artan sıcaklığın enzim aktivasyonunu düşürmemesi için buz banyosuna oturtulmuştur.

Enzim aktiviteleri ölçümleri için ise; hücreler 6000 rpm, 4 °C, 10 dk santrifüjlendikten sonra üreme ortamı ile % 4 (w/v) oranında çözeltisi hazırlanmıştır. 40 W güçteki 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 2 dk hücrelere uygulanmıştır.

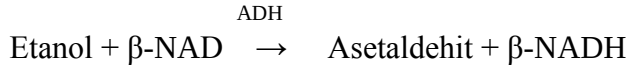
3.2.2.2 Mekanik parçalama uygulama yöntemi

Üreyen hücreler 6000 rpm, 4 °C, 20 dk santrifüjlendikten sonra üreme ortamı/tampon ortamı ile % 5-15 (w/v) oranında çözeltisi hazırlanmıştır. Mekanik homojenizer (Micra D-9, 50 Hz, 850W, 11.000 dk⁻¹) ile 45s uygulama+15s ara 1-4 kez tekrarlanarak hücreler parçalanmıştır. Mekanik parçalama uygulanırken de mikroorganizmanın bulunduğu beher, uygulama sırasında artan sıcaklığın enzim aktivasyonunu düşürmemesi için buz banyosuna oturtulmuştur.

3.2.3 ADH aktivitesi belirleme yöntemi

Derasemizasyon tepkimesini katalizleyecek enzimi içeren uygun mikroorganizmayı seçebilmek için farklı mikroorganizmalarda bulunan alkol dehidrojenaz (ADH) enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Hücre süspansiyonu, SÖD uygulandıktan sonra, 20 mM etanol çözeltisi ve 20 mM NAD (pH 7 fosfat tamponundaki çözeltisi) içeren karışıma

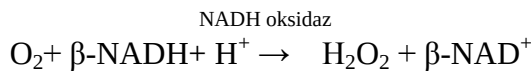
eklenmiş ve UV Spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1601) 340 nm dalga boyunda analizlenmiştir. Burada ADH enzimlerinin katalizlediği etil alkolün yükseltgenme tepkimesiyle oluşan β -NADH'ın 340 nm dalga boyunda absorbansta neden olduğu artış ölçülmektedir. Tepkime spektrofotometre küveti içinde takip edilmiştir.



UV spektrofotometrede 340 nm'de takip edilen absorbansın zamanla değişiminin eğiminden birim zamandaki absorbans değişimi bulunmuştur. EK 2'deki β -NADH'a ait kalibrasyon grafiğinden birim zamanda birim hacimde oluşan NADH mol sayısı ve dolayısıyla harcanan etanol mol sayısı hesaplanmıştır. 1 ünite (U); 25°C, pH 7'de bir dakikada 1 μ mol etanolü yükseltgeyen enzim miktarıdır (Cea vd. 2009). Aktivite hasaplama yöntemi EK 2'de verilmiştir.

3.2.4 NADH oksidaz aktivitesi belirleme yöntemi

Derasemizasyon prosesinde kofaktör rejenerasyonu tepkimesini katalizeyecek enzim olan NADH oksidazın farklı mikroorganizmalardaki aktivitesi araştırılmıştır. Hücre süspansiyonu, SÖD uygulandıktan sonra, 1 mM dithiotreitol ve 0.1 mM NADH (pH 7.5 potasyum fosfat tamponundaki çözeltisi) içeren karışıma eklenmiş ve UV Spektrofotometresinde 340 nm dalga boyunda analizlenmiştir. Burada NADH oksidaz enzimlerinin katalizlediği O_2 'nin H_2O_2 'ye dönüşümü tepkimesiyle azalan β -NADH'ın 340 nm dalga boyunda absorbansta neden olduğu azalış ölçülmektedir (Hummel ve Riebel 2003). Tepkime spektrofotometre küveti içinde takip edilmiştir. 1 ünite (U); 25°C, pH 7.5'da bir dakikada 1 μ mol β -NADH'ı dönüştüren enzim miktarıdır. Enzim aktiviteleri, EK 2'deki β -NADH kalibrasyon grafiği ve hesaplama yöntemi kullanılarak ADH enzim aktivitesiyle benzer şekilde hesaplanmıştır.



3.2.5 Biyotransformasyon tepkime koşulları

Biyokatalitik derasemizasyon tepkimesinde substrat olarak kullanılan rasemik propranolol Sigma'dan temin edilmiştir.

Tepkimede enzim kaynağı olarak kullanılacak mikroorganizmalar, üredikten sonra süzülerek ya da 6000 rpm, 4 °C'da 20 dk santrifüjlenerek istenen derişimi sağlayacak şekilde tartılıp yaş hücre olarak biyotransformasyon ortamına (üreme ortamı/tampon ortamı) koyulmuştur. Tampon ortamı olarak fosfat tamponu (pH 7) kullanılmıştır. Hücelere SÖD/mechanik parçalama uygulanarak ya da hiçbir uygulama yapılmadan hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. İstenen derişim için saf rasemik propranolol hücre süspansiyonuna eklenmiş ve 10 mL tepkime hacminde, 30 °C ve 180 rpm'deki orbital çalkalayıcıda, tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Kofaktör rejenerasyonunu sağlayacak olan tepkimenin substratı moleküler oksijen olduğundan 250 mL'lik tepkime kabı kullanılmıştır. Tepkime süresi sonunda tepkime ortamı (üreme ortamı/tampon ortamı) kloroformla 2 kez ekstrakte edilmiş, çözücüsü uzaklaştırılmış ve etanolde çözülerek HPLC analizine hazırlanmıştır. Deneyler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalaması alınmıştır.

Sadece, *L. kefir* hücreleri ile gerçekleştirilen ilk tepkimeler farklı koşullarda gerçekleştirilmiştir. İstenen derişim için tartılan saf rasemik propranolol Tris-HCl (50 mM, pH 7) tamponunda çözünmüştür. Üreyen hücreler 4500 rpm, 4 °C, 10 dk santrifüjlendikten sonra istenen derişimi sağlayacak şekilde tartılıp tepkime kabına eklenmiş ve 10 mL tampon ortamında, 30 °C, 180 rpm'deki orbital çalkalayıcıda tepkimeler gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 HPLC analizi

Tepkime sonunda analizler HPLC ile çizelge 3.12'de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.12 HPLC analiz koşulları

HPLC	Kolon	Hareketli faz	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	Kolon Sıcaklığı	UV Dedektör Dalga Boyu
Thermo Finnigan Spectra System	Chiralcel OD (4.6 x 250 mm)	n-hegzan / etanol	0.8 mL/dk	20 µL	30 °C	280 nm

Analiz sonuçlarına göre % ee ve % C hesabı yapılmıştır. % ee, propranololün enantiyomerik aşırılığını ifade etmekte ve eşitlik 3.1'den hesaplanmaktadır. % C ise (S)-propranololün dönüşümünü ifade etmekte ve eşitlik 3.2'den hesaplanmaktadır. % C hesabında, (R)-propranololün dönüşmediği varsayılmıştır.

$$\% ee = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada; C_R ve C_S sırasıyla (R)-propranolol ve (S)-propranololün derişimini ifade etmektedir.

$$\% C = \frac{C_{So} - C_S}{C_{So}} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada; C_{So} ve C_S sırasıyla (S)-propranololün başlangıç derişimini ve tepkime sonrasında ortamda kalan (S)-propranololün derişimini ifade etmektedir.

Analizlerdeki standart sapma ve varyasyon katsayısı (% CV) değerleri, değerlendirilen bir numune için sırasıyla 0.1 (% ee = 35 ± 0.1) ve 0.3 olarak hesaplanmıştır.

Saf rasemik propranololün ekstraksiyonu sonrası yapılan HPLC analizinin sonucu, örnek kromatogram olarak EK 3'te verilmiştir. Buna göre; R-propranololün kalma süresi 7 dk, S-propranololün kalma süresi ise 8 dk olarak görülmektedir.

3.2.7 FTIR analizi

Rasemik propranololün derasemizasyonu mekanizmasını aydınlatabilmek için bazı örneklerin FTIR analizleri Kimya Mühendisliği Bölümü, Süperkritik Akışkan Teknolojisi Laboratuvarı'nda bulunan Shimadzu FTIR-8040 Spektrofotometre cihazında gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında elde edilmiştir.

3.2.8 HRMS analizi

HRMS (Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi) analizleri, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. MS Sistemi, Waters SYNAPT G1 MS'dir. Tam kütle analizi pozitif modda (ES+) 50-1000 Da aralığında yapılmıştır (ESI-TOF-MS).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

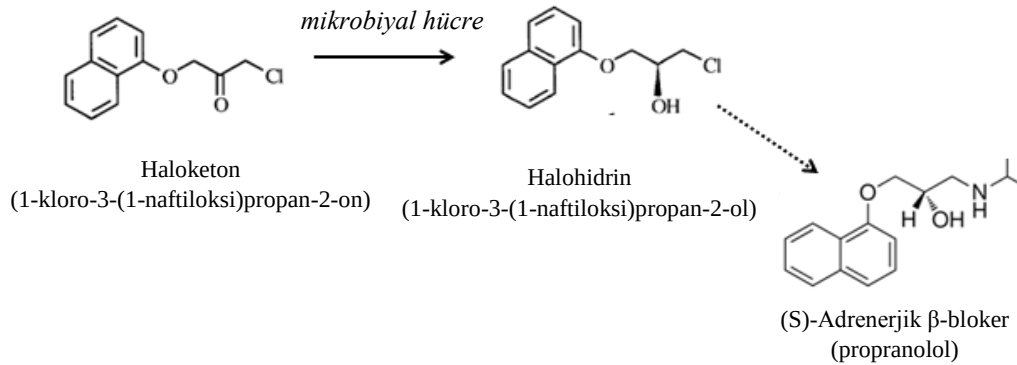
Bu çalışmada; farmasötik açıdan önem taşıyan β -blokerlardan biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi için;

- Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi
- Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu

olmak üzere iki yöntem incelenmiştir. Bu iki yöntemle ilgili elde edilen bulgular sırasıyla verilmiştir.

4.1 Haloketonların Seçimli Mikrobiyal İndirgenmesi ile Propranololün Öncü Maddesi Olan Halohidrinlerin Üretimi

Kiral halohidrinler, kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan adrenerjik β -bloker'ların sentezlenmesinde çıkış maddeleridir. Literatürde halohidrinlerin eldesi için birçok yöntem bulunmaktadır (Martinez vd. 2000). Bunlardan stereoseçimli indirgenme tepkimesi, (S)-adrenergik β -bloker'ların sentezlenmesinde anahtar tepkimedir (Martinez Lagos vd. 2004). Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi bir halohidrin olan 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol, propranololün öncü bileşenidir ve bu çalışmada bir haloketon olan 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-on'un seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile üretilmesi hedeflenmiştir.



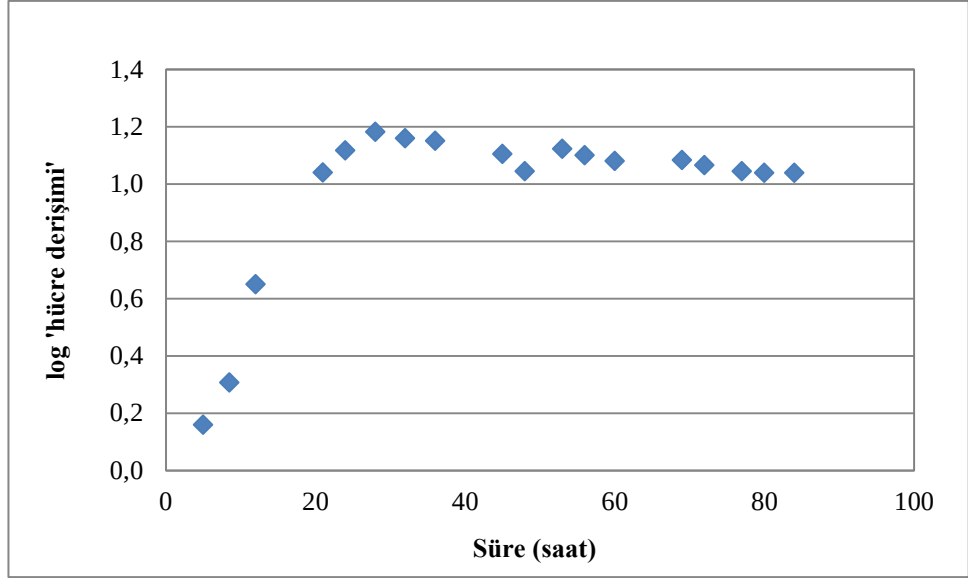
Şekil 4.1 Haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi

4.1.1 Haloketonun indirgenme tepkimesi için uygun mikroorganizmanın seçilmesi ve hücre üreme eğrisinin oluşturulması

Haloketonun stereoseçimli indirgenme tepkimesinde biyokatalizör olarak alkol dehidrojenaz (ADH) enzim kaynağı olan bir mikroorganizma kullanılacağından öncelikle mikroorganizma seçimi yapılmıştır. Literatür araştırmasına göre; 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-onun indirgenmesinde en iyi sonuçlar *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (S-seçimli) ve *Pichia mexicana* CECT 11015 (R-seçimli) mikroorganizması ile elde edilmiştir (Martinez vd. 2000, Martinez Lagos vd. 2002, Martinez Lagos vd. 2004, Martinez Lagos ve Sinisterra 2005). β -blokerlardan biri olan propranololün S-enantiyomeri kardiyovasküler ilaçlarda R-enantiyomerinden daha aktif olduğu ve R-halohidrinden elde edilebildiği göz önüne alınarak haloketonun indirgenmesi tepkimesinde kullanılmak üzere *Pichia mexicana* CECT 11015 mikroorganizması seçilmiş ve ‘Spanish Type Culture Collection (CECT)’dan temin edilmiştir.

Pichia mexicana CECT 11015 mikroorganizması tepkimede enzim kaynağı olarak kullanılacağından hücrenin üreme süresini belirlemek için hücre üreme eğrisi oluşturulmuştur. Hücre üreme eğrisini oluşturabilmek için; ekim yapılan sıvı üreme ortamından zamanla örnek alınıp UV spektrofotometrede $\lambda=400$ nm’de absorbans ölçümü yapılarak hücrenin üremesi takip edilmiştir. Hücre üremesi sırasında zamanla alınan absorbans verilerinden ve yaş hücre derişimi için çizilen kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak şekil 4.2’de verilen hücre üreme eğrisi (yaş hücre) oluşturulmuştur. Buna göre, en uygun hücre üreme süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

Bu durumda, haloketon sentezi gerçekleştirildiğinde haloketonun indirgenme tepkimesinde, *Pichia mexicana* mikroorganizması 24 saatlik üreme süresi sonunda tepkimede alkol dehidrojenaz (ADH) enzim kaynağı olarak kullanılabilecek duruma getirilmiştir.

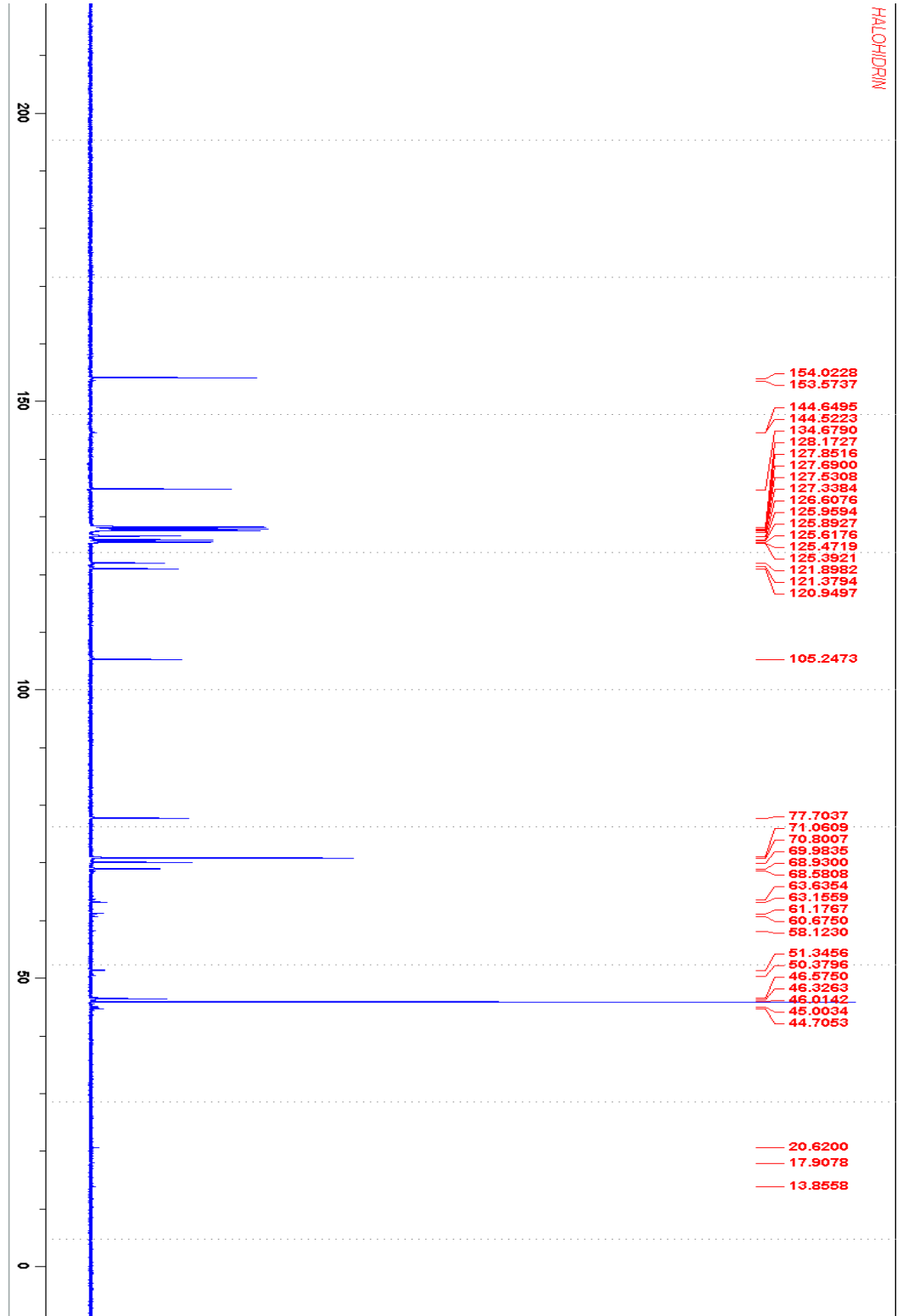


Şekil 4.2 *Pichia mexicana* hücre üreme eğrisi

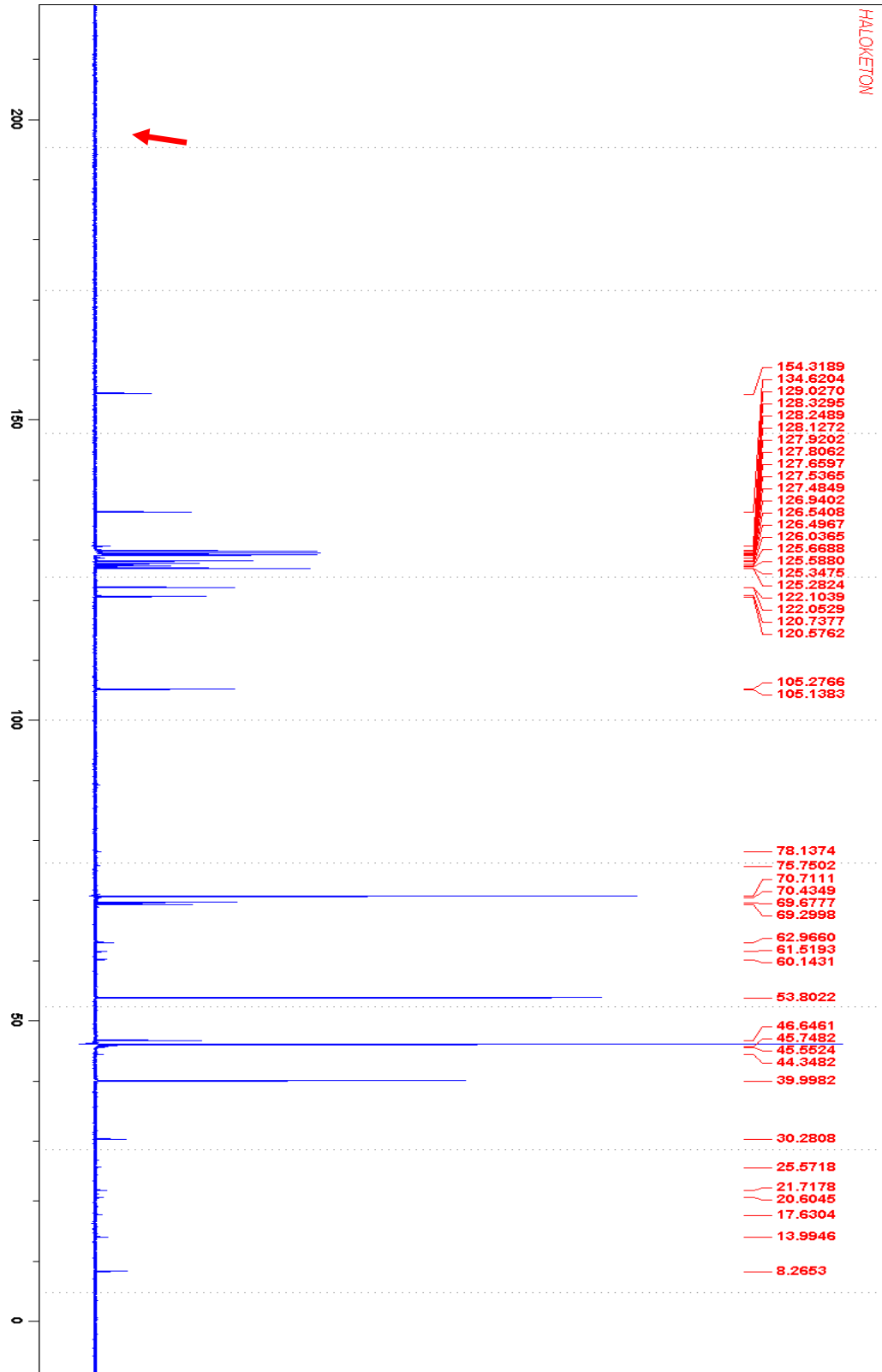
(T=26 °C, KH=180 rpm)

4.1.2 Halohidrin ve haloketonun sentezi

Seçimli mikrobiyal indirgenme ile halohidrinlerin üretimi tepkimesinde substrat olarak kullanılacak olan haloketon (1-kloro-3-(1-naftiloksi) propan-2-on) ticari olarak piyasada bulunmadığından kimyasal olarak sentezlenmeye çalışılmıştır (Martinez vd. 2000). Haloketonlar, rasemik epihalohidrinlerin uygun fenollerle o-alkillenmesi sonucu oluşan halohidrinlerin oksidasyonu ile elde edildiklerinden haloketonun sentezlenebilmesi için ilk olarak halohidrin (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol) sentezlenmiştir. Kimyasal olarak sentezlenen halohidrin rasemik karışım halindedir. Sentezlenen halohidrin ve haloketon numunelerinin ^{13}C NMR analizleri yaptırılarak sentez sonucunda elde edilen maddelerin yapısının aydınlatılması ve istenen maddelerin oluşup oluşmadığının anlaşılması amaçlanmıştır. Halohidrin ve haloketona ait ^{13}C NMR sonuçları sırasıyla şekil 4.3 ve şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3 Sentezlenen halohidrinin ^{13}C NMR analizi sonucu



Şekil 4.4 Sentezlenen haloketonun ^{13}C NMR analizi sonucu

Martinez vd. (2000) çalışmasında aynı yöntemle elde edilen halohidrine ait ^{13}C NMR sonuçları aşağıda verilmiştir:

^{13}C NMR δ : 46.5 ($\text{CH}_2\text{-Cl}$), 68.8 (CH-OH), 70.1 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 105.2 (C_2 , Ar), 121.2 (C_4 , Ar), 121.7 (C_8 , Ar), 125.5 (C_9 , Ar), 125.6 (C_7 , Ar), 125.9 (C_3 , Ar), 126.7 (C_6 , Ar), 127.7 (C_5 , Ar), 134.6 (C_{10} , Ar), 153.9 (C_1 , Ar) ppm.

Şekil 4.3'teki NMR analiz sonuçları incelendiğinde Martinez vd. (2000) çalışmasındaki NMR sonuçlarıyla çok uyumlu olduğu ve dolayısıyla istenen yapının olduğu anlaşılmıştır.

Martinez vd. (2000) çalışmasında aynı yöntemle elde edilen haloketona ait ^{13}C NMR sonuçları da aşağıda verilmiştir:

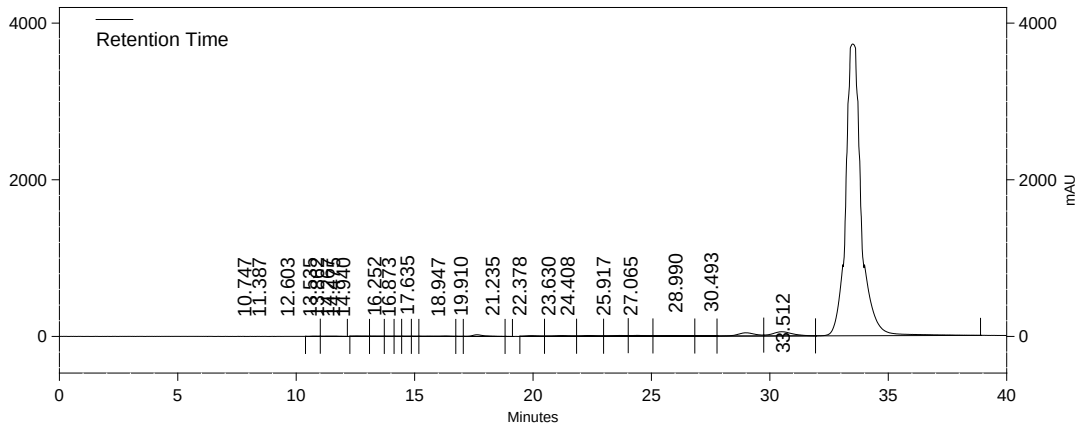
^{13}C NMR δ : 47.0 ($\text{CH}_2\text{-Cl}$), 71.9 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 104.9 (C_2 , Ar), 121.6 (C_4 , Ar), 122.0 (C_8 , Ar), 125.2 (C_9 , Ar), 125.6 (C_7 , Ar), 125.9 (C_3 , Ar), 126.9 (C_6 , Ar), 127.8 (C_5 , Ar), 134.7 (C_{10} , Ar), 153.1 (C_1 , Ar), 199 (C=O) ppm.

Şekil 4.4'teki NMR analiz sonuçları incelendiğinde Martinez vd. (2000) çalışmasındaki NMR sonuçlarıyla genel olarak uyumlu olduğu fakat yapıda özellikle önemli olan C=O yapısının oluşmadığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla C=O yapısının oluşması için haloketonun sentezi üzerine çalışmalara devam edilmiştir.

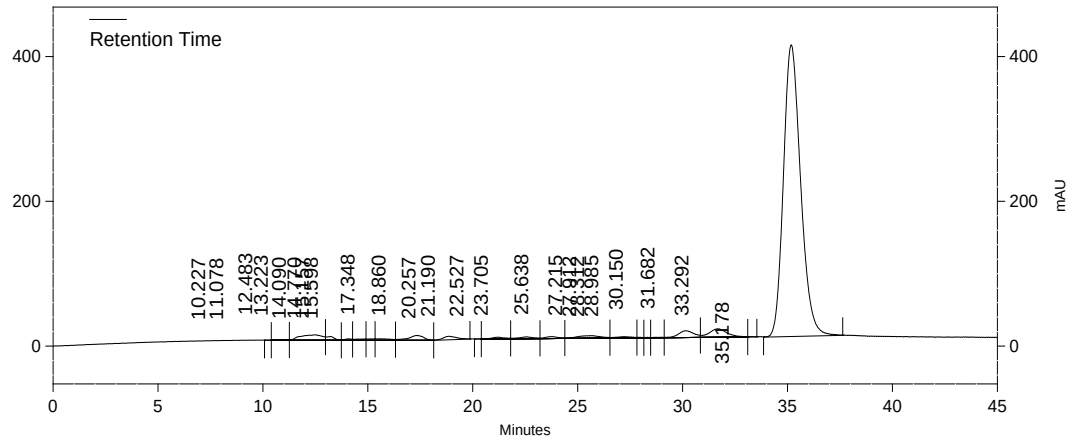
Halohidrin ve haloketonun HPLC analizleri Bölüm 3.1.4 'Halohidrin ve haloketonun HPLC analizi' başlığı altında belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Fakat NMR analiz sonuçlarına göre haloketonun sentezinin gerçekleşmediği anlaşıldığından tez kapsamında onunla ilgili yapılan HPLC analizi çalışmalarından bahsedilmeyecektir.

Halohidrin analizi için sentez sonucu elde edilen maddenin saf olduğu kabul edilerek 10 mM derişiminde çözeltisi hazırlanarak analizlenmiştir. Elde edilen kromatogram şekil

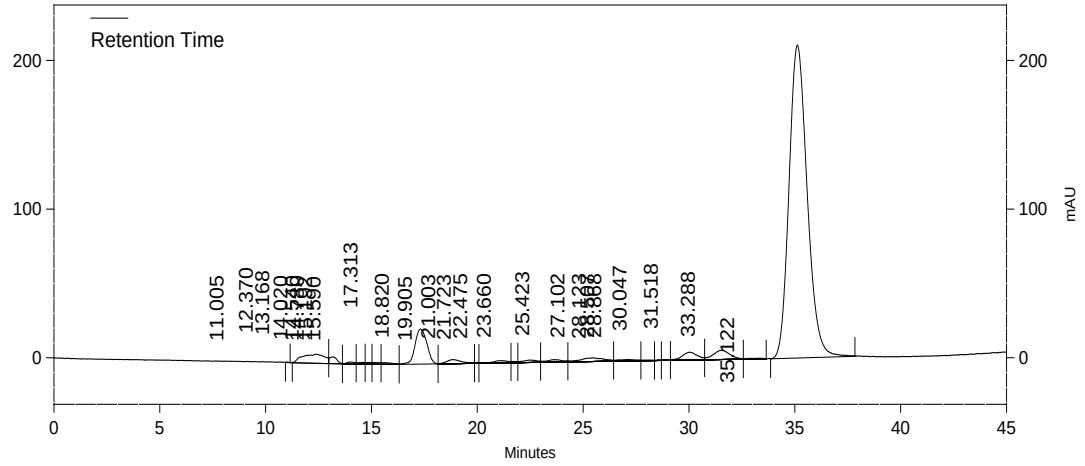
4.5'te verilmiştir. Fakat halohidrinin saf olarak piyasada bulunmaması nedeniyle halohidrinin enantiyomerlerine ait olan pikler tam olarak tespit edilememiştir. Rasemik karışım olan halohidrine ait iki eşit pik beklenirken 28 ve 30. dakikalarda iki küçük pik ve 33. dakikada büyük bir pik elde edildiği gözlenmiştir. Bu analiz sonucuna göre, derişimin yüksek olup kolonun enantiyomerleri ayıramadığı ve 33. dakikadaki pikin rasemik karışıma ait olabileceği düşünülerek daha düşük derişimlerde örnekler hazırlanarak analizlenmiştir. Şekil 4.6, şekil 4.7 ve şekil 4.8'de sırasıyla 1, 0.5 ve 0.1 mM derişimindeki çözeltilere ait kromatogramlar verilmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre seyreltik çözeltelerde de 33. dakikadaki pikin ayrıışmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle şekil 4.5'teki kalma süresi 28 ve 30 dk olan piklerin rasemik halohidrine ait pikler olabileceği ya da Martinez Lagos ve Sinisterra'ya (2005) göre R ve S halohidrinin kalma sürelerinin sırasıyla 12.5 dk ve 14.2 dk olduğu dikkate alınarak 10-27 dakikalari arasında çıkan diğer piklerden ikisinin halohidrin pikleri olabileceği ihtimali göz önüne alınmıştır. Bu nedenle sentezlenen halohidrinin daha yüksek derişimlerde çözeltileri analizlenmiştir. Böylece düşük derişimlerde yüksekliği az olan piklerin daha net olarak gözlenebileceği düşünülmüştür. 20 mM ve 50 mM derişimindeki halohidrin çözeltilerine ait kromatogramlar sırasıyla şekil 4.9 ve şekil 4.10'da verilmiştir.



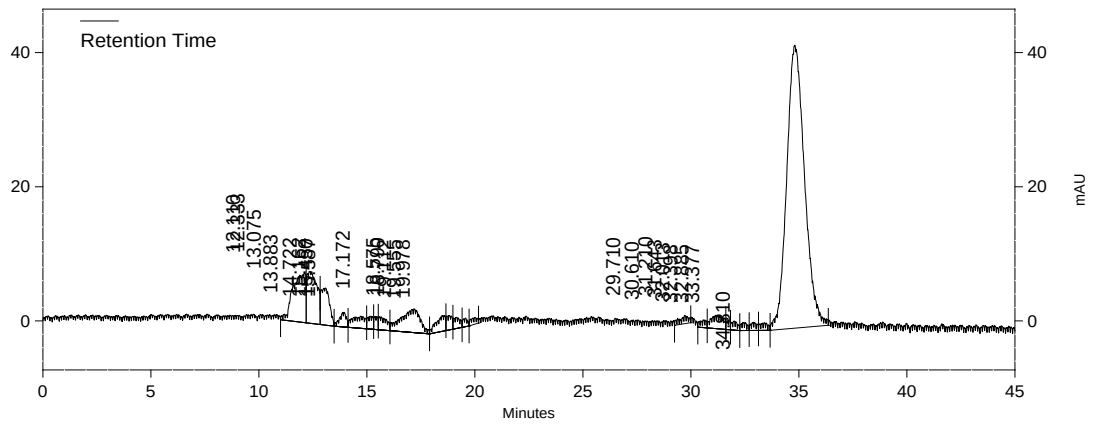
Şekil 4.5 Halohidrin (10 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı



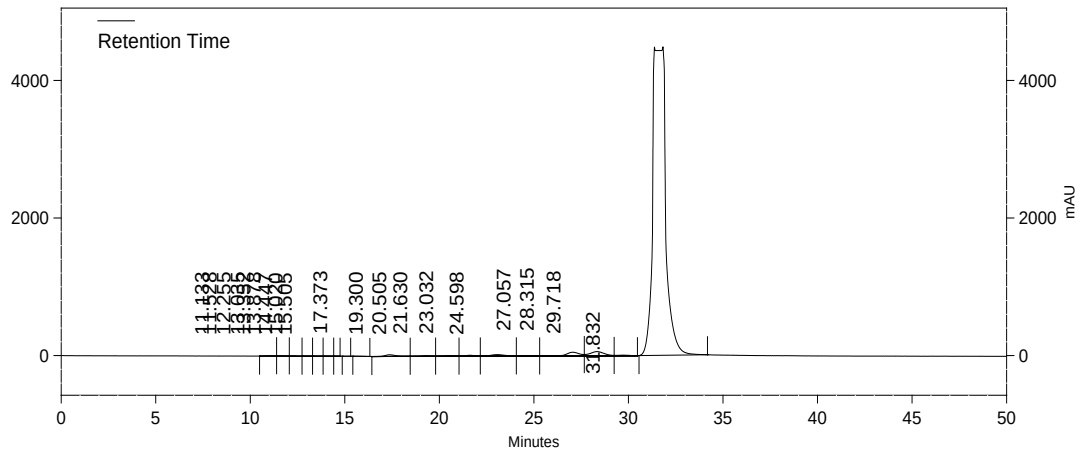
Şekil 4.6 Halohidrin (1 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı



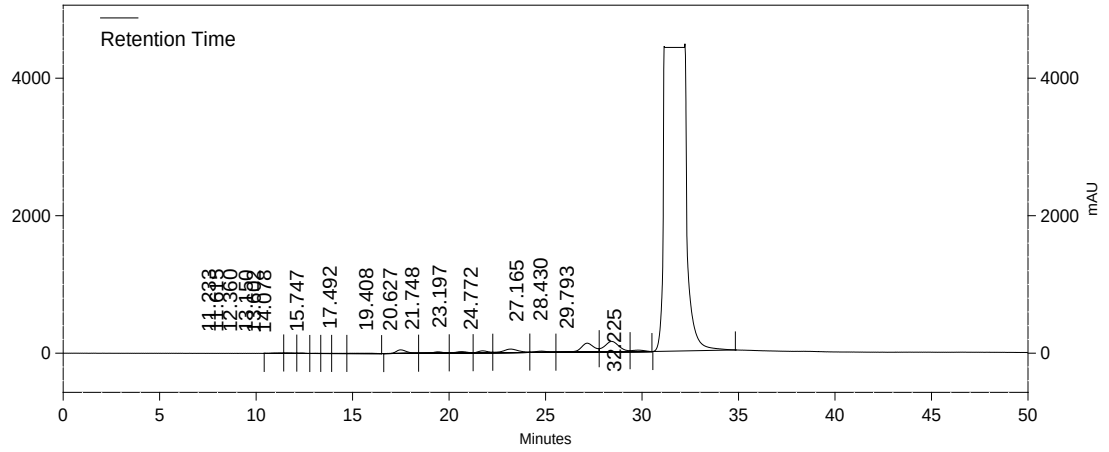
Şekil 4.7 Halohidrin (0.5 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.8 Halohidrin (0.1 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.9 Halohidrin (20 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.10 Halohidrin (50 mM) analizi sonucu elde edilen HPLC kromatogramı

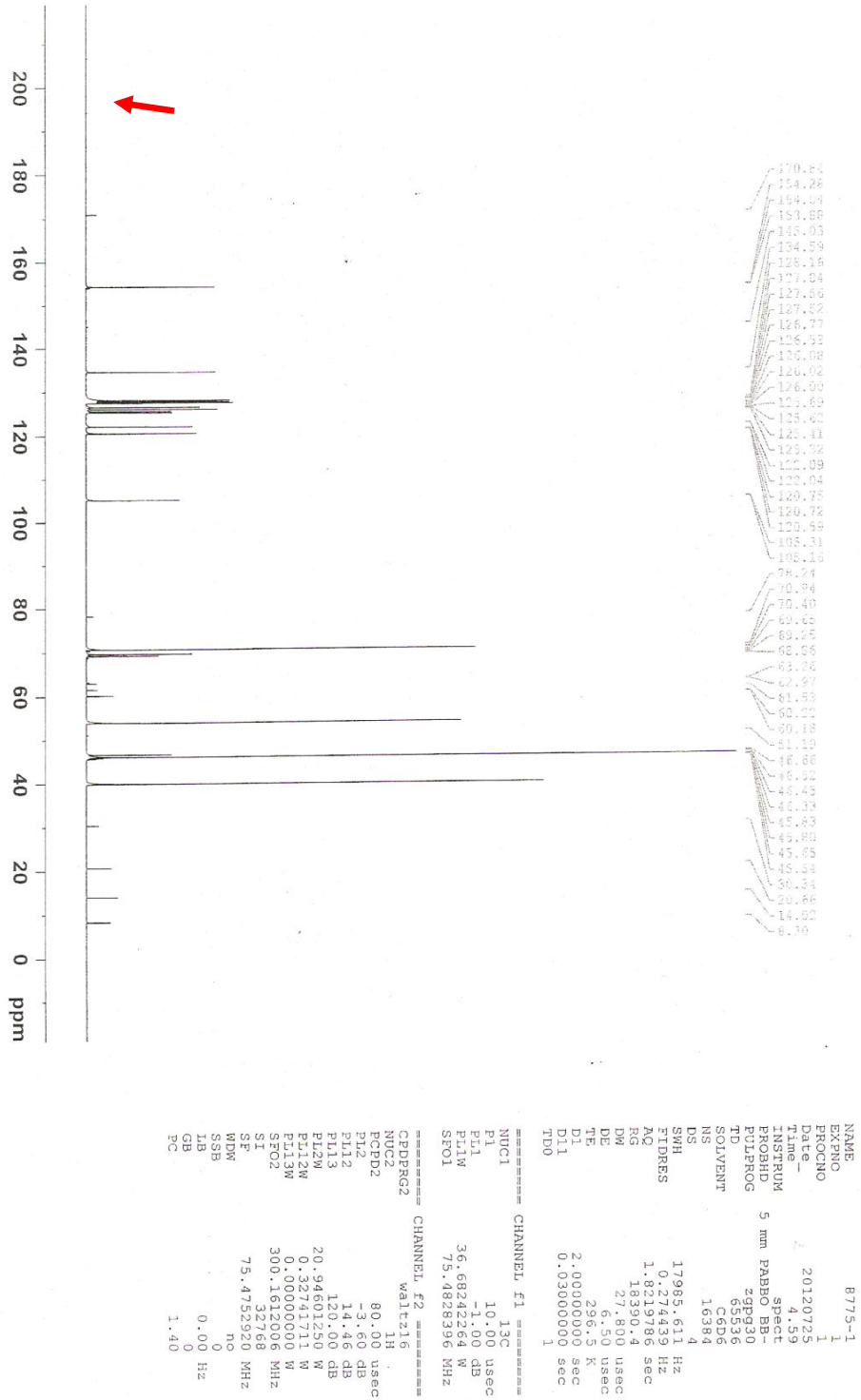
Şekil 4.9'a göre 27. ve 28. dakikalarda çıkan pikler ile alanları da birbirine yakın olan ve Martinez Lagos ve Sinisterra (2005) çalışmasında olduğu gibi birbirine yakın kalma sürelerine sahip olan 19. ve 20. dakikalardaki piklerin halohidrin enantiyomerlerine ait pikler olabileceği düşünülmektedir. Fakat her iki ihtimal için de enantiyomerlerin pikleri birbirine çok yakın ve ayrışma tam olmadığından, halohidrin ve haloketonun sentez yöntemi oturtulduğunda sentezlenen numuneler için gradyen çalışma yapılarak ayrışmayı artırmak ve bu şekilde pik alanlarının eşitlenme durumunu gözlemlemek planlanmıştır.

Daha önce bahsedildiği gibi sentezlenen halohidrin ve haloketon örneklerinin ^{13}C NMR analizlerine göre halohidrinin sentezinin gerçekleştiği fakat haloketonun sentezinin gerçekleşmediği anlaşılmıştır. Bu nedenle haloketonun sentezi üzerinde durularak $\text{C}=\text{O}$ yapısının oluşması için haloketon sentez yönteminde bazı parametreler değiştirilerek sentez gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu parametrelerden biri organik fazın vakumda değiştirildiği adımda daha düşük basınçlara inilmesidir. Önceki yöntemde 790 mbar'da gerçekleştirilen çözücü uzaklaştırma sırasında basınç atmosferik basınçtan çok farklı olmadığı için uzun sürede gerçekleşirken haloketonun bozunması ihtimaline karşı basınç değeri 200 mbar olarak değiştirilmiştir. Bununla birlikte küçük miktarlarda çalışmanın yarattığı deneysel sıkıntıları aşarak gelebilecek deneysel hataları minimize etmek amacıyla Bölüm 3.1.2 “Haloketon Sentezi” bölümünde belirtilen yöntemdeki miktarlar 2 katına çıkarılarak sentez gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen haloketona ait NMR analizi sonucu şekil 4.11’de verilmiştir.

Martinez vd. (2000) çalışmasında elde edilen haloketona ait ^{13}C NMR sonuçları aşağıda verilmiştir:

^{13}C NMR δ : 47.0 ($\text{CH}_2\text{-Cl}$), 71.9 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 104.9 (C_2 , Ar), 121.6 (C_4 , Ar), 122.0 (C_8 , Ar), 125.2 (C_9 , Ar), 125.6 (C_7 , Ar), 125.9 (C_3 , Ar), 126.9 (C_6 , Ar), 127.8 (C_5 , Ar), 134.7 (C_{10} , Ar), 153.1 (C_1 , Ar), 199 ($\text{C}=\text{O}$) ppm.

Şekil 4.11’deki NMR analiz sonuçları incelendiğinde önceki çalışmaya benzer şekilde, safsızlıklar olmasına rağmen Martinez vd. (2000) çalışmasındaki NMR sonuçlarıyla genel olarak uyumlu olduğu fakat yapıda özellikle önemli olan $\text{C}=\text{O}$ yapısının oluşmadığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla değiştirilen parametrelerin olumlu bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Fakat, ^{13}C NMR’da karbonil grubunun ($\text{C}=\text{O}$) gözükmebileceği bilgisinden yola çıkarak aynı örneğin ^1H NMR analizi yaptırılmış ve şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.11 Sentezlenen haloketonun ^{13}C NMR analizi sonucu

Martinez vd. (2000) çalışmasında aynı yöntemle elde edilen haloketona ait ^1H NMR sonuçları da aşağıda verilmiştir:

^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) d: 4.53 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{—Cl}$), 4.92 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{—O}$), 6.68 (d, 1H, Ar—H), 7.35 (t, 1H, Ar—H), 7.51 (m, 3H, Ar—H), 7.81 (m, 1H, Ar—H), 8.25 (m, 1H, Ar—H) ppm

Şekil 4.12'deki NMR analiz sonuçları incelendiğinde çok fazla safsızlık olduğu ve Martinez vd. (2000) çalışmasındaki NMR sonuçlarıyla uyumlu olmadığı ve dolayısıyla haloketonun sentezlenemediği anlaşılmıştır. Bu nedenle haloketon sentezi ile ilgili çalışmalara devam edilmiştir.

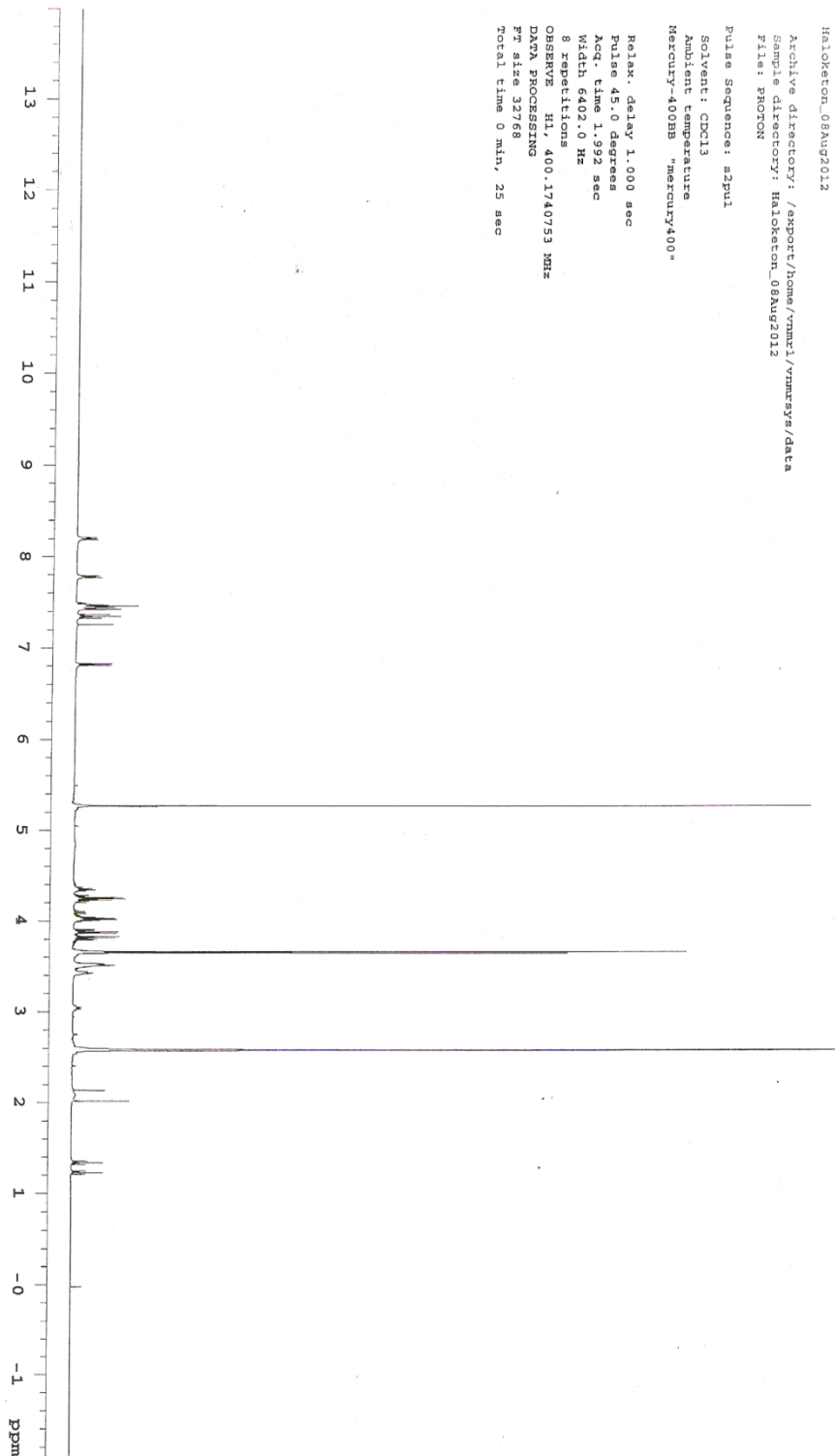
Bu çalışmada haloketonun elde edilebilmesi için gerçekleştirilmek istenen Swern Yükseltgenmesi ile halohidrinin yükseltgenmesidir. Nishide vd. (2002) çalışmasında, Swern Yükseltgenmesi yapılmış ve tipik yöntem olarak trietilamin damla damla eklendikten sonra 200 dk $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar kademeli ısıtma ve su banyosunu kaldırdıktan sonra 1 saat karıştırarak oda sıcaklığına ıltma işlemleri uygulanmıştır. Bu çalışmadan yola çıkılarak “Haloketon Sentezi” bölümünde belirtilen yöntemde (normal ölçekte) 5. adımda yer alan trietilamini damla damla ekleyip sonrasında karıştırma (60 dk) ve su banyosunu kaldırıp karıştırarak (40 dk) oda sıcaklığına getirme şeklinde bir yöntem denenmiştir. Bu yöntemle sentezlenen haloketona ait ^1H NMR sonucu şekil 4.13'te verilmiştir. Buna göre, sentezlenen numunede çok fazla safsızlık olduğu ve Martinez vd. (2000) çalışmasındaki NMR sonuçlarıyla uyumlu olmadığı sonucuna varılmıştır.

1000

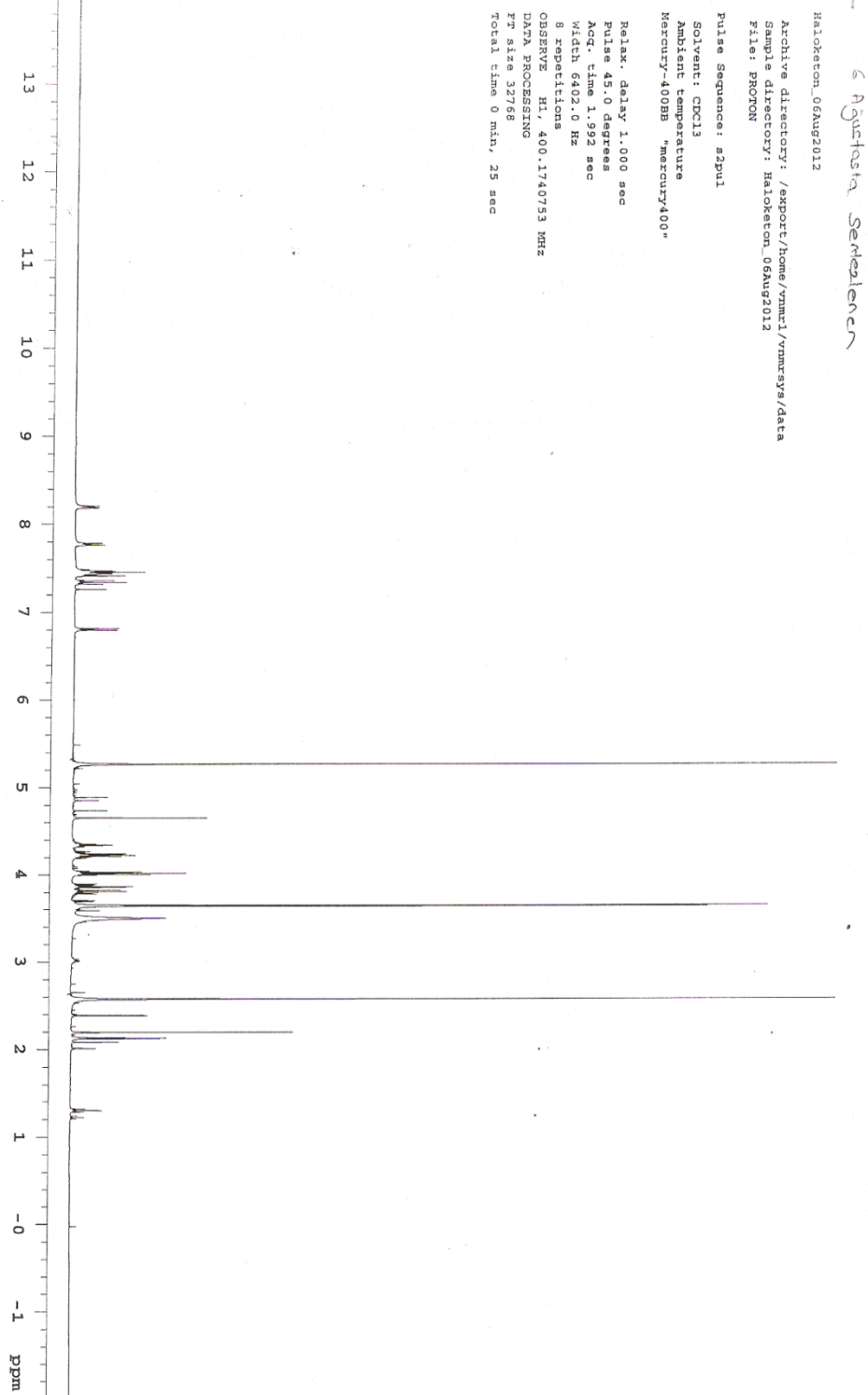
2025 RELEASE UNDER E.O. 14176

File: PROTON

1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	12
13	13	13
14	14	14
15	15	15
16	16	16
17	17	17
18	18	18
19	19	19
20	20	20
21	21	21
22	22	22
23	23	23
24	24	24
25	25	25
26	26	26
27	27	27
28	28	28
29	29	29
30	30	30
31	31	31
32	32	32
33	33	33
34	34	34
35	35	35
36	36	36
37	37	37
38	38	38
39	39	39
40	40	40
41	41	41
42	42	42
43	43	43
44	44	44
45	45	45
46	46	46
47	47	47
48	48	48
49	49	49
50	50	50
51	51	51
52	52	52
53	53	53
54	54	54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
64	64	64
65	65	65
66	66	66
67	67	67
68	68	68
69	69	69
70	70	70
71	71	71
72	72	72
73	73	73
74	74	74
75	75	75
76	76	76
77	77	77
78	78	78
79	79	79
80	80	80
81	81	81
82	82	82
83	83	83
84	84	84
85	85	85
86	86	86
87	87	87
88	88	88
89	89	89
90	90	90
91	91	91
92	92	92
93	93	93
94	94	94
95	95	95
96	96	96
97	97	97
98	98	98
99	99	99
100	100	100

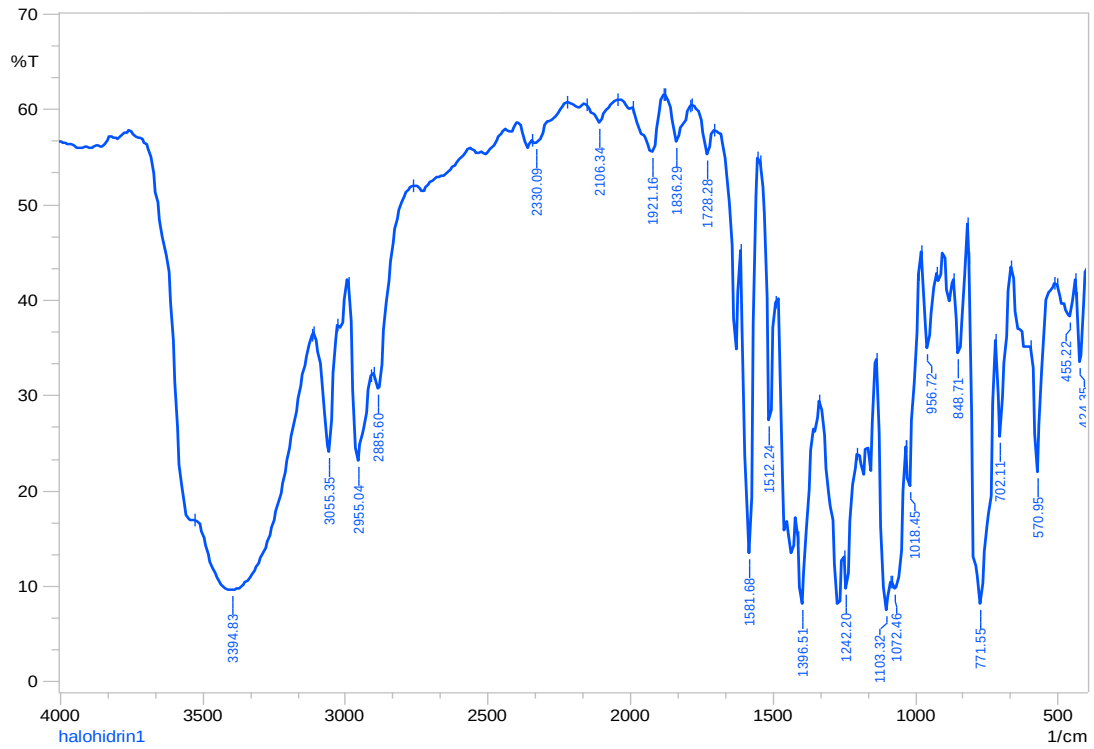
[illegible]

Şekil 4.12 Sentezlenen haloketonun ^1H NMR analizi sonucu

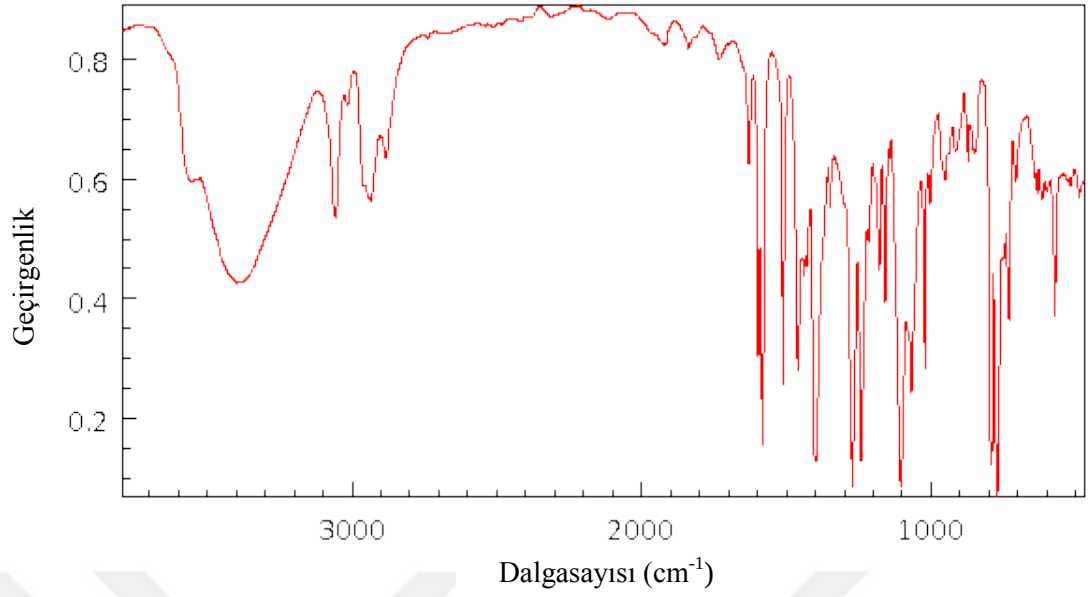


Şekil 4.13 Sentezlenen haloketonun ^1H NMR analizi sonucu

Daha önce, sentezlenen halohidrin numunelerinin ^{13}C NMR analizlerine göre elde edilen sonucun Martinez vd. (2000) çalışmasındaki NMR sonuçlarıyla uyumlu olduğu ve dolayısıyla istenen yapının olduğu anlaşıldığından bahsedilmiştir. Fakat halohidrinin sentezlenebildiğinden emin olabilmek için ek bir analiz yöntemi olarak FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucu elde edilen sonuç şekil 4.14'te verilmiştir. Literatürde bu maddenin (1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-ol) FTIR spektrumuna rastlanmamıştır. Fakat şekil 4.15'te verilen FTIR spektrumu (<https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C20133931&Type=IR-SPEC&Index=0#IR-SPEC>, 2013) ile sentezlenen halohidrinin FTIR spektrumu (Şekil 4.14) birbirleriyle örtüşmektedir. Bununla birlikte O-H esneme titreşim frekansı absorpsiyonlarının $3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ arasında olduğu bilgisine dayanarak şekil 4.14'te 3394 cm^{-1} 'de gözlenen pik de, bir alkol olan halohidrinin sentezinin gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



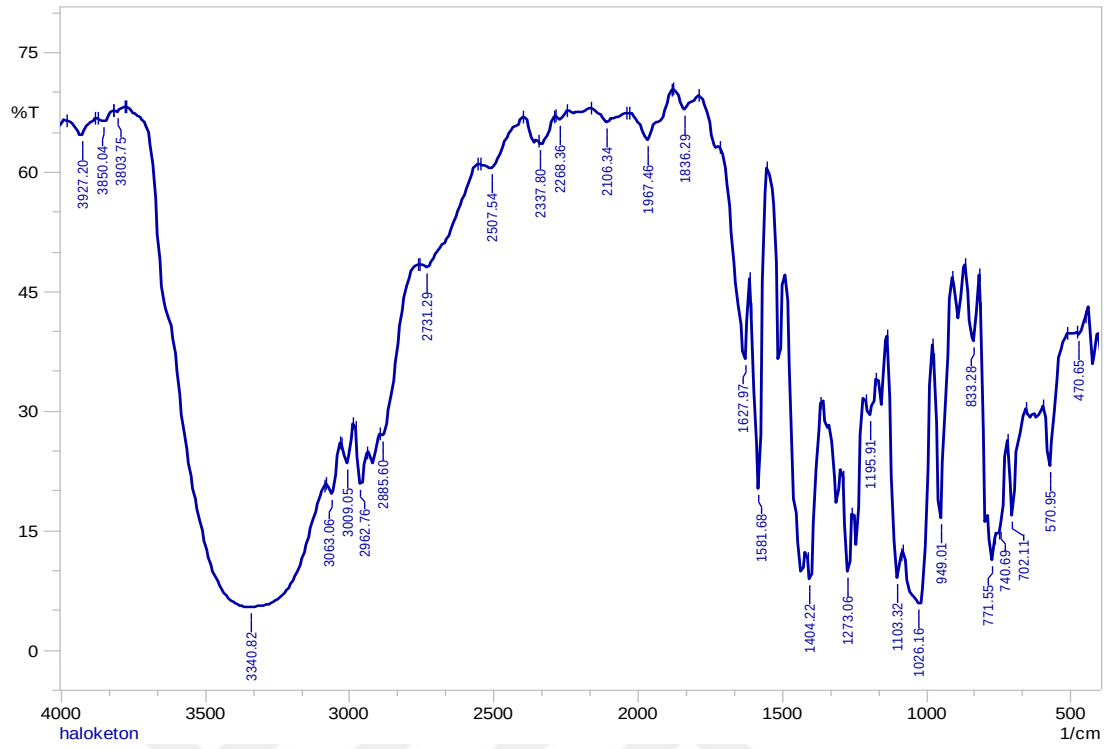
Şekil 4.14 Sentezlenen halohidrinin FTIR analizi sonucu



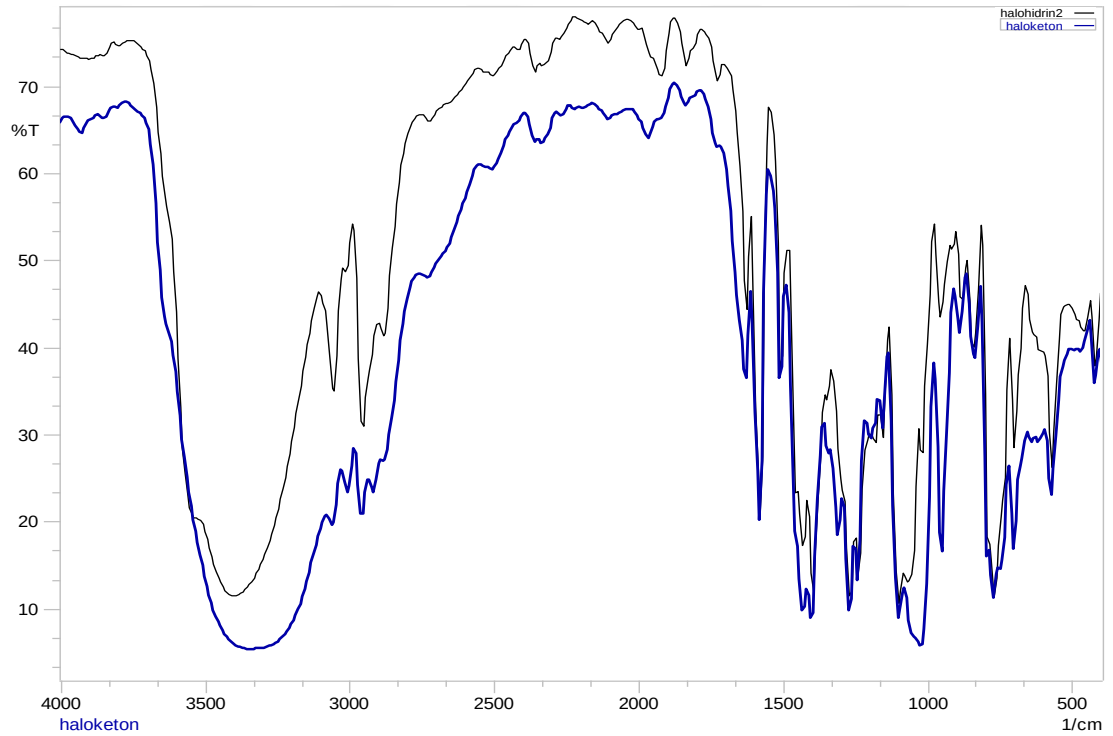
Şekil 4.15 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-olün IR Spektrumu
(<https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C20133931&Type=IR-SPEC&Index=0#IR-SPEC>, 2013)

Ayrıca şekil 4.11 - 4.12’de NMR analiz sonuçları verilen, haloketon sentezi yöntemiyle elde edilen numunenin de FTIR analizi yapılmış ve elde edilen spektrum şekil 4.16’da verilmiştir. Herhangi bir kaynaktan haloketona ait FTIR spektrumu bulunamasa da keton esneme titreşimlerinin $1690-1760\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında gözlemlendiği bilindiğinden bu değerler arasında belirgin bir pik olmaması da haloketonun sentezlenemediğini göstermektedir. Haloketon, kimyasal olarak sentezlenen alkolün (halohidrin) yükseltgenmesiyle elde edildiğinden yapıda meydana gelen değişimlerin görülebilmesi için şekil 4.14 ve şekil 4.16’da verilen halohidrin (siyah çizgi) ve haloketon (mavi çizgi) FTIR spektrumları karşılaştırılmış olarak şekil 4.17’de verilmiştir.

Sonuç olarak, FTIR analiz sonuçlarına göre de; halohidrin sentezinin gerçekleştiği, fakat haloketon sentezinin gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Böylece ^{13}C NMR ve ^1H NMR haloketon sonuçlarının FTIR analiz sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.16 Sentezlenen haloketonun FTIR analizi sonucu



Şekil 4.17 Haloketon ve halohidrinin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması

Haloketonların mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün çıkış maddesi olan halohidrinlerin üretimi için, haloketonun saf hali ticari olarak satılmadığından sentezlenmeye çalışılmıştır. Haloketonun sentezlenmesi için ön basamak olan halohidrinin kimyasal sentezi başarıyla gerçekleştirilmiş fakat haloketonun sentezi tüm uğraşlara rağmen gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle haloketonların mikrobiyal olarak seçimli indirgenmesi ile propranololün çıkış maddesi olan enantiyomerik saflıktaki halohidrinlerin üretimi yapılamamış ve doktora çalışmasına rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi yöntemiyle devam edilmiştir.

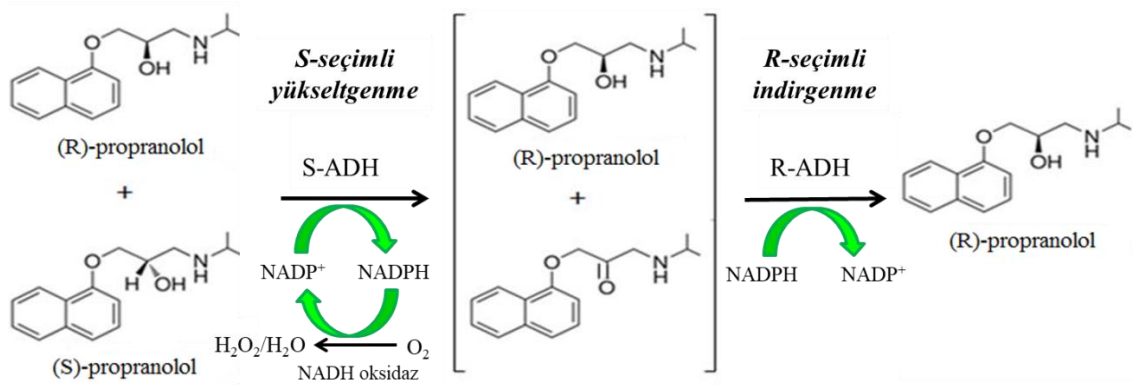
4.2 Rasemik Propranololün Biyokatalitik Derasemizasyonu

Mikrobiyal katalizörlerde en yeni konulardan biri olan, aynı tepkime kabında mikrobiyal stereoinversiyonla derasemizasyon, rasemik karışımdan % 100 teorik verimle enantiyomerik saflıkta bileşiklerin elde edilmesi için en ilgi çekici yöntemlerden biridir. Yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri, aynı tepkime kabında ardışık olarak gerçekleşmektedir ve yükseltgenme-indirgenme yönteminde oksidoredüktazlar büyük öneme sahiptir. Tepkime boyunca bir enantiyomer genellikle karbonil ara ürüne yükseltgenmekte iken diğer enantiyomer değişmeden kalmaktadır ve sonra ara ürün ters enantiyomere indirgenmektedir. Bu yüzden bu yaklaşım rasematin tek bir stereoizomerik ürüne dönüşümüne izin veren etkili bir yaklaşımdır (Li vd. 2016).

Çalışma kapsamında şekil 4.18’de verilen mekanizmaya göre; rasemik propranololün ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri ile biyokatalitik derasemizasyonu gerçekleştirilerek enantiyomerik saflıkta propranolol elde edilmesi amaçlanmıştır. Sekonder amino alkollerin ve bir sekonder amino alkol olan propranololün derasemizasyonu ile ilgili literatürde sadece tek bir çalışma vardır ve onun da kapsamı çok kısıtlıdır. Bu nedenle şekil 4.18’de verilen mekanizma, sekonder alkollerin derasemizasyonu ile ilgili çalışmalar (Voss vd. 2008b, Mantovani vd. 2009, Li vd. 2010, Nasario vd. 2016) referans alınarak önerilmiştir. Rasemik propranololün biyotransformasyonu ile ilgili literatürde yer alan bu çalışmada (Damle vd. 2000)

propranololün mikrobiyal biyotransformasyonuna sadece pH ve süre etkisi incelenmiş, tepkimenin gerçekleşme mekanizması ya da hangi enzimler tarafından katalizlendiğine dair de hiçbir bilgiye yer verilmemiştir.

Bu çalışmada ise, öncelikle şekil 4.18’de verilen mekanizmanın ilk basamağı olan yükseltgenme tepkimesi üzerinde durulmuştur. Yükseltgenme tepkimesi bir oksidoredüktaz enzimi olan alkol dehidrojenaz (ADH) enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilecektir. ADH enzimi ise hücre içi bir enzim olup (Gowda vd. 1991) kofaktör gerektirmektedir ve kofaktörler pahalıdır. Tüm hücre kullanıldığı durumda hücre içinde bulunan ve rejenere olan kofaktörler prosesin ekonomikliğini sağlaması açısından oldukça önemlidir. Örneğin, NADH oksidaz enziminin moleküler oksijenden su ya da hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumunu katalizlerken aynı zamanda kofaktör rejenerasyonunu sağladığı bilinmektedir. Kofaktör rejenerasyonu için kosubstrat gerektirmemesi ve böylece yan ürün oluşturmaması açısından NADH oksidaz enziminin kullanılması avantajlıdır (Sudar vd. 2014). Tüm bu nedenlerle yükseltgenme tepkimesinde kullanılmak üzere ADH ve NADH oksidaz enzimlerini ve kofaktörlerini içeren bir mikroorganizma araştırılmıştır.

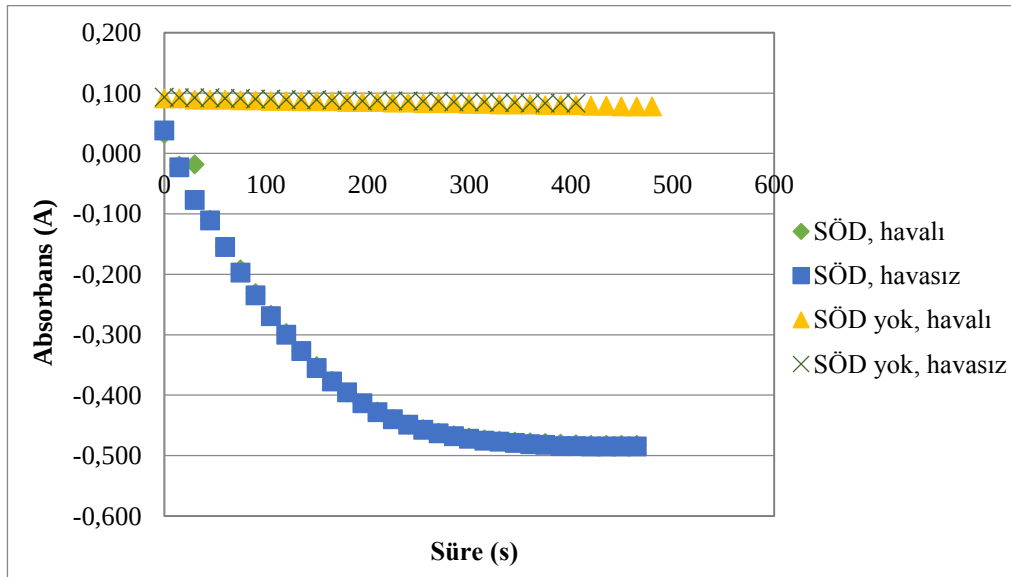


Şekil 4.18 Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi

4.2.1 Enzim aktiviterinin belirlenmesi

4.2.1.1 *L. kefir*'de bulunan NADH oksidaz enzim aktiviterinin belirlenmesi

Lactobacillus kefir mikroorganizmasının ADH enzimini içerdiği bilinmektedir (Temino vd. 2005). NADH oksidaz enzimini içerip içermediği ise enzim aktivitesine bakılarak araştırılmıştır. Geueke vd. (2003) çalışmasından başka bir *Lactobacillus* türü olan *Lactobacillus brevis* mikroorganizmasının O_2 'li ortamda üretildiğinde NADH oksidaz aktivitesinin, O_2 'siz ortamda üretildiğinde ADH aktivitesinin daha yüksek olduğu bilgisi edinilmiştir. Bu nedenle, O_2 'li ve O_2 'siz ortamda üretilen *L. kefir*'e SÖD uygulanmadan ve SÖD uygulanarak (20 kHz, 80 W, 1 dk sürekli SÖD+1 dk ara, 3 kez uygulama, hücre üreme ortamında) hazırlanan hücre süspansiyonlarının NADH oksidaz aktiviterine bakılmış ve absorbansın zamanla değişimi şekil 4.19'da verilmiştir. Buna göre, O_2 'li ve O_2 'siz ortamda üretilen mikroorganizmaların NADH oksidaz aktiviterinin çok yakın olduğu, fakat SÖD uygulanmasının hücre zarında bulunan NADH oksidaz enziminin (Kumar vd. 2002) serbest kalması için çok etkili olduğu gözlenmiştir. SÖD uygulanmış hücre süspansiyonlarında enzim aktivitesi yaklaşık 100 kat daha fazla bulunmuştur. Aktivitelerin sayısal değerleri çizelge 4.1'de verilmiştir.



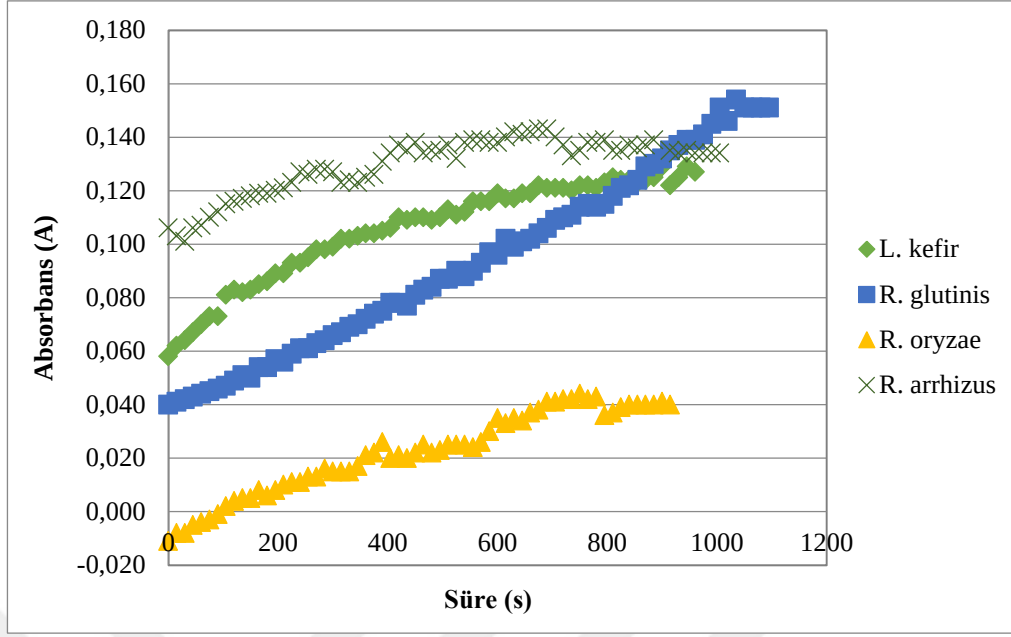
Şekil 4.19 *L. kefir*'de NADH oksidaz aktivitesi ölçümü sırasında absorbansın zamanla değişimi ($\lambda=340$ nm, 1 mM dithiotreitol, 0.1 mM NADH (pH 7.5 potasyum fosfat tamponu), SÖD (20 kHz, 80 W, (1 dk sürekli SÖD+1 dk ara) x 3 kez))

Çizelge 4.1 *L. kefir*'deki NADH oksidaz aktiviteleri ($\lambda=340$ nm, 1 mM dithiotreitol, 0.1 mM NADH (pH 7.5 potasyum fosfat tamponu), SÖD (20 kHz, 80 W, (1 dk sürekli SÖD+1 dk ara) x 3 kez))

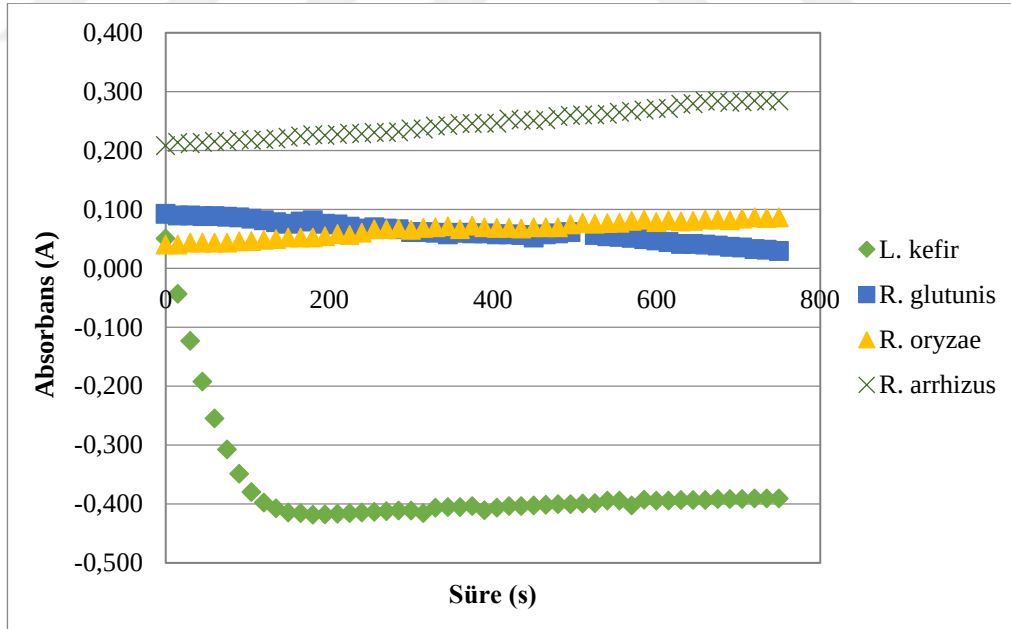
Hücre	Aktivite (U/mL)
SÖD uygulanmış, O ₂ 'li ortamda üretilen	0.5310
SÖD uygulanmış, O ₂ 'siz ortamda üretilen	0.5720
SÖD uygulanmamış, O ₂ 'li ortamda üretilen	0.0046
SÖD uygulanmamış, O ₂ 'siz ortamda üretilen	0.0045

4.2.1.2 Farklı mikroorganizmaların ADH ve NADH oksidaz aktivitelerinin belirlenmesi

Farklı mikroorganizmaların ADH ve NADH oksidaz aktiviteleri belirlenerek yükseltgenme tepkimesini katalizleyecek *L. kefir*'den daha yüksek enzim aktivitesine sahip mikroorganizma araştırılmıştır. Bu amaçla *Rhodotorula glutinis* DSM 70398, *Rhizopus oryzae* CBS 111718, *Rhizopus arrhizus* ve karşılaştırma amacıyla *Lactobacillus kefir* NRRL B-1839 mikroorganizmaları Bölüm 3.2.2.1'de belirtilen koşullarda SÖD uygulanarak hücre süspansiyonları hazırlanmış, ADH ve NADH oksidaz aktiviteleri ölçülmüştür. Buna göre; zamanla elde edilen absorbands değişimleri şekil 4.20 - 4.21'de, hesaplanan aktivite değerleri çizelge 4.2 - 4.3'te verilmiştir. Enzim aktivite ölçümlerine göre, kullanılan mikroorganizmalar arasında ADH ve NADH oksidaz aktivitesi en yüksek olan mikroorganizma *L. kefir* olarak belirlenmiştir. *Rhizopus oryzae* ve *Rhizopus arrhizus*'da NADH oksidaz aktivitesi tespit edilememiştir. Fakat, bu durumun enzime zarar vermemek ve eşit şartlarda uygulama yapmak için kısa süreli uygulanan SÖD koşullarının (40 W güçteki 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 2 dk) toplanarak üreyen bu mikroorganizmalarda ADH ve NADH oksidaz enzimlerinin hücre dışına çıkması için yeterli gelmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu mikroorganizmaların tepkimede kullanılıp, içerisindeki enzimlerin tepkimeyi stereoseçimli olarak katalizleyip katalizlememe durumunun araştırılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.20 Farklı mikroorganizmalarda ADH aktivitesi ölçümü sırasında absorbansın zamanla değişimleri ($\lambda=340$ nm, 20 mM etanol ve 20 mM β -NAD (pH 7 fosfat tamponundaki çözeltisi), SÖD (40 W, 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 2 dk))



Şekil 4.21 Farklı mikroorganizmalarda NADH oksidaz aktivitesi ölçümü sırasında absorbansın zamanla değişimleri ($\lambda=340$ nm, 1 mM dithiotreitol, 0.1 mM NADH (pH 7.5 potasyum fosfat tamponu), SÖD (40 W, 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 2 dk))

Çizelge 4.2 ADH aktiviteleri ($\lambda=340$ nm, 20 mM etanol, 20 mM β -NAD (pH 7 fosfat tamponundaki çözeltisi), SÖD (40 W, 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 2 dk))

Mikroorganizma	Aktivite (U/mL)
<i>L. kefir</i> (O_2 'siz ortamda üretilen)	0.0370
<i>R. glutinis</i>	0.0161
<i>R. oryzae</i>	0.0205
<i>R. arrhizus</i>	0.0156

Çizelge 4.3 NADH oksidaz aktiviteleri ($\lambda=340$ nm, 1 mM dithiotreitol, 0.1 mM NADH (pH 7.5 potasyum fosfat tamponu), SÖD (40 W, 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 2 dk))

Mikroorganizma	Aktivite (U/mL)
<i>L. kefir</i> (O_2 'siz ortamda üretilen)	0.960
<i>R. glutinis</i>	0.014
<i>R. oryzae</i>	-
<i>R. arrhizus</i>	-

4.2.2 Propranololün derasemizasyonuna mikroorganizma türünün etkisi

Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi için çalışmada farklı türde mikroorganizmalar (bakteri, maya, küf mantarı) kullanılarak, bu prosesin gerçekleşmesi için uygun mikroorganizmalar saptanmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sırasında kullanılan mikroorganizmalar aşağıda verilmiştir:

- *Lactobacillus kefir* NRRL B-1839
- *Rhodotorula glutinis* DSM 70398
- *Lactobacillus brevis*
- *Rhizopus arrhizus*
- *Rhizopus oryzae* CBS 111718
- *Rhizopus arrhizus* NCIM 997
- *Geotrichum candidum* NCIM 980

Bu mikroorganizmalar kullanılarak elde edilen bulgular sırasıyla verilecektir.

4.2.2.1 *Lactobacillus kefir* NRRL B-1839

Rasemik propranololden enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi için öncelikle ADH ve NADH oksidaz enzimlerinin aktivite ölçümlerinde en yüksek sonuçların elde edildiği *L. kefir* mikroorganizması kullanılarak bu tepkime gerçekleştirilmiştir. Yapılan ilk deneylerde tepkime sonunda girdi ve ürünleri organik faza çekmek için uygun çözücünün seçimi konusunda denemeler yapılmıştır. Seçilecek çözücü hem su ile çift faz oluşturmali hem de propranololu çözmelidir. Bu amaçla; propranolün kinetik rezolüsyonu ile ilgili bir çalışmadan (Chiou vd. 1997) edinilen bilgiye dayanarak hekzan, toluen, di-izopropil eter, MTBE ve etil asetat çözücüleri denenmiş fakat propranololu çözmemişlerdir. Propranololu çözdüğü bilinen (Santoro vd. 2001) Hekzan: Etanol (75:25) çözücüsü denendiğinde ise etanol, ekstraksiyon sırasında sulu faza geçmiştir. Damle vd. (1999) çalışmasına dayanarak kloroform ile ekstraksiyon gerçekleştirilebilmiştir. Gerçekleştirilen tepkimelerin koşulları ve elde edilen % ee değerleri çizelge 4.4'te verilmiştir. Buna göre; % ee değerleri çok düşüktür. Bu tepkimlerden birinde kofaktör rejenerasyonu için gerekli olan kofaktörlerden NADPH, rejenerasyonu başlatıcı olarak görev yapması için az miktarda eklenip etkisi araştırılmıştır. Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi bu durumun da bir etkisi olmamıştır.

Çizelge 4.4 *L. kefir* ile rasemik propranololün yükseltgenmesi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.5), 0.5 mM NADPH, $T=30$ °C, $KH=180$ rpm)

Mikroorganizma derişimi (g/L)	Süre (gün)	NADPH ilavesi	% ee
200	6	-	1.52
200	6	√	1.50

Geueke vd. (2003) çalışmasından başka bir *Lactobacillus* türü olan *Lactobacillus brevis* mikroorganizmasının O_2 'li ortamda üretildiğinde NADH oksidaz aktivitesinin, O_2 'siz ortamda üretildiğinde ADH aktivitesinin daha yüksek olduğu bilgisi edinilmiştir. Bu

bilgi doğrultusunda, her iki ortamda üretilen *L. kefir* mikroorganizmasından eşit miktarda hücre kullanılarak, daha düşük substrat derişiminde tepkimeler gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.5'te verilmiştir. Görüldüğü gibi substrat derişiminin düşmesi ve O₂'li ve O₂'siz ortamda üretilen hücrelerin birlikte kullanılmasının kayda değer bir etkisi olmamıştır.

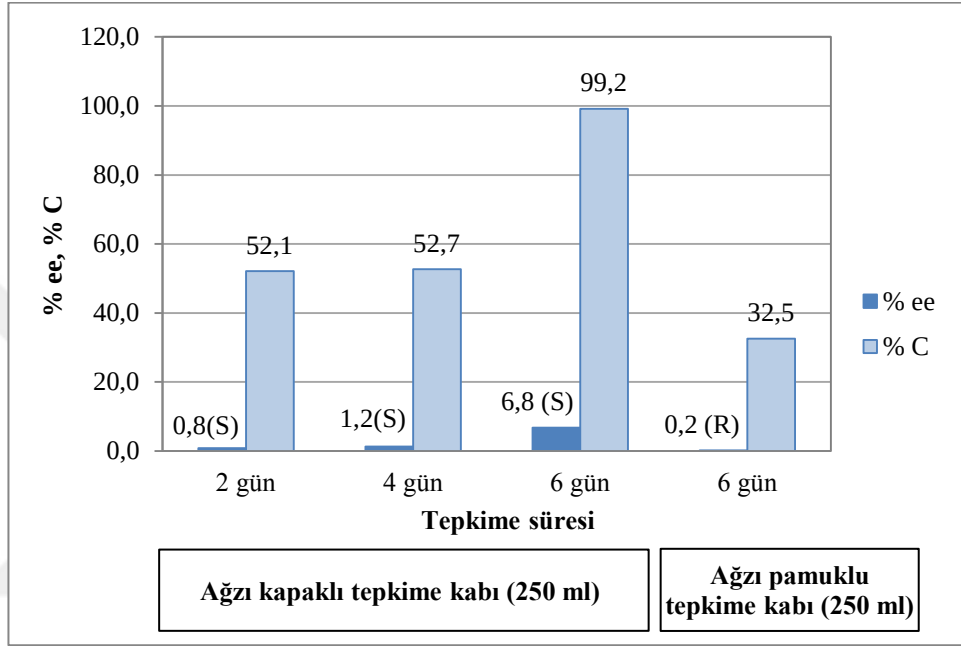
Çizelge 4.5 *L. kefir* ile rasemik propranololün yükseltgenmesi (C₀=0.1 mM, V=10 mL, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7), 5 gün, 0.5 mM NAD, T=30 °C, KH=180 rpm)

Mikroorganizma derişimi (g/L)	NAD ilavesi	% ee	Konfigürasyon	% C
20 (10 +10)*	-	3.1	S	9.9
200 (100+100)*	-	3.2	R	33.3
400 (200+200)*	-	3.4	R	39.8
200 (100+100)*	√	3.6	R	23.7

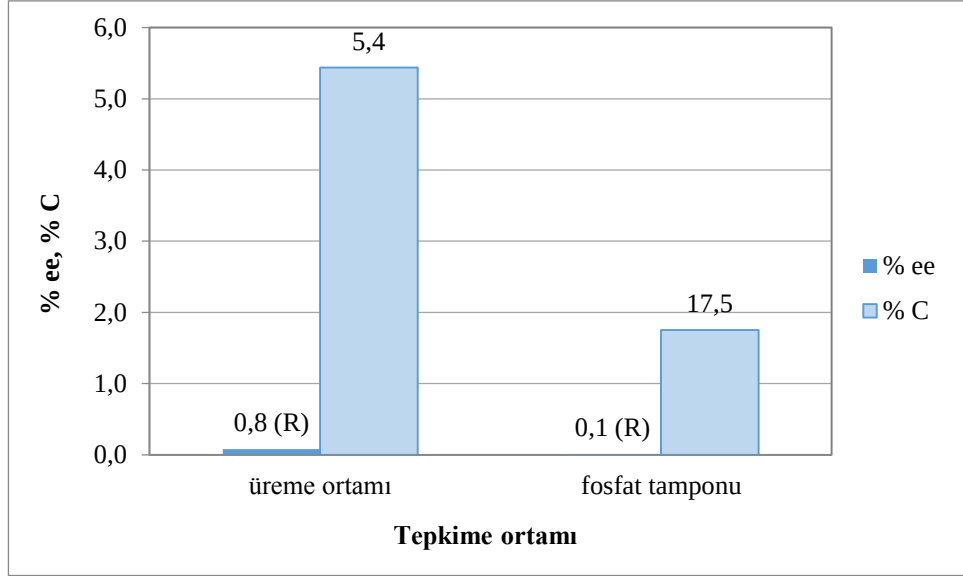
* O₂'li ve O₂'siz ortamda üretilen *L. kefir* mikroorganizmasından eşit miktarda hücre kullanılmış ve tepkime ortamındaki derişimleri parantez içinde belirtilmiştir.

Daha sonra, hücre içi olduğu bilinen ve aktiviteleri ölçülerek *L. kefir* de bulunduğu saptanan ADH ve NADH oksidaz enzimlerinin serbest kalması için hücrelere SÖD uygulanmıştır. Ayrıca, yine O₂'li ve O₂'siz ortamda üretilen *L. kefir* mikroorganizmasından eşit miktarda hücre kullanılarak tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.18'de verilen kofaktör rejenerasyonunun sağlanması için moleküler oksijen gerektiğinden kesikli tepkime kabının hacmi yüksek tutulmuş (250 mL) ve tepkime süresinin etkisi incelenmiştir. Ayrıca, oksijen miktarının yüksek tutulması için bir de kesikli tepkime kabının üst kısmı pamuklu tutularak tepkime kabındaki oksijen miktarının 6 günlük tepkime boyunca daha fazla olmasının sonuçlara etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.22'de verilmiştir. Buna göre, 250 mL hacmindeki ağzı kapaklı kesikli tepkime kabında 6 günün sonunda ağzı pamuklu olan kesikli tepkime kabına göre nispeten daha yüksek % ee değeri (% 6.8) elde edilmiştir. Ayrıca, önceki sonuçlarla karşılaştırıldığında hücrelere SÖD uygulanmasının önemli bir etkisi olmamıştır. Bu nedenle SÖD uygulaması yapılmadan bir de tepkime ortamının etkisi incelenmiştir. Tepkimeler ağzı kapaklı tepkime kabında üreme ortamı ve fosfat

tamponunda (pH 7) gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.23'te verilmiştir. Tepkime üreme ortamında gerçekleştirildiğinde % C değeri daha yüksek olarak elde edilmiştir. Fakat % ee değerleri çok düşük olduğundan *L. kefir* mikroorganizmasının bu tepkimeyi stereoseçimli olarak katalizleyemediği anlaşılmış ve çalışmalara başka mikroorganizmalarla devam edilmiştir.



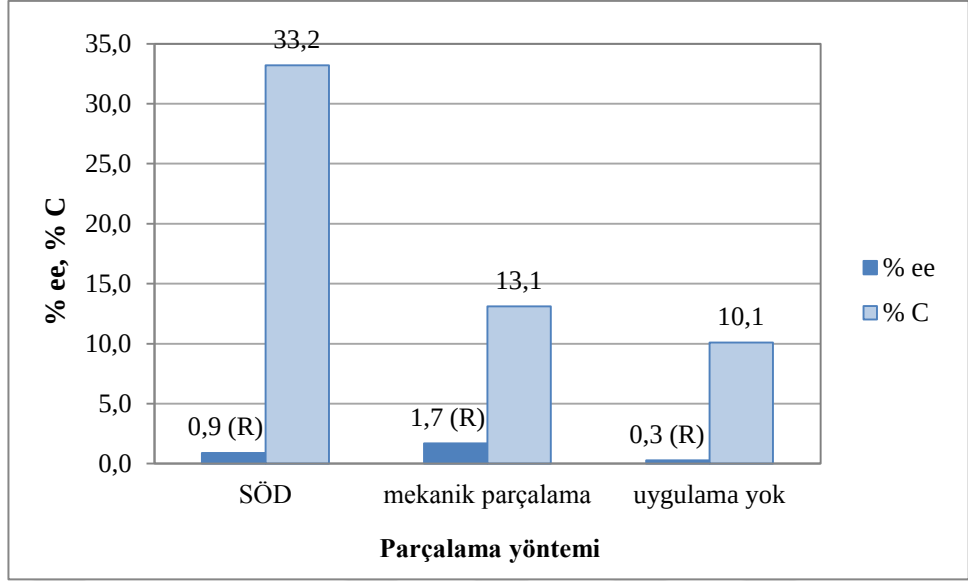
Şekil 4.22 *L. kefir* ile rasemik propranololün yükseltgenmesine süre ve tepkime kabının etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *L. kefir* = 0.75 g havalı+ 0.75 g havasız, % 15 w/v hücre derişimindeki üreme ortamında 2 dk SÖD (pulse:1s+1s), $T=30$ °C, KH=200 rpm)



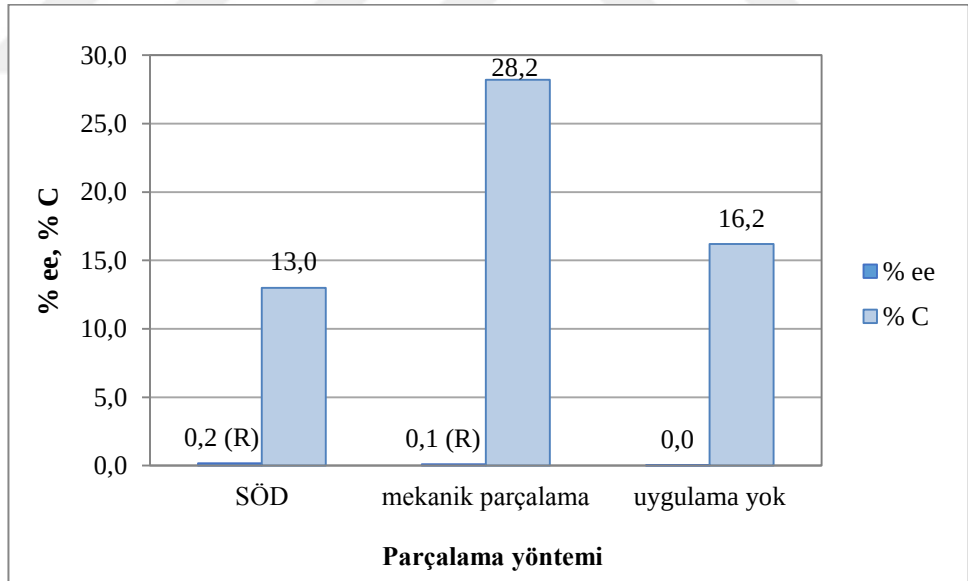
Şekil 4.23 *L. kefir* ile rasemik propranololün yükseltgenmesinde tepkime ortamının etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *L. kefir* = 0.5 g havalı+ 0.5 g havasız, Süre=6 gün, $T=30$ °C)

4.2.2.2 *Rhodotorula glutinis* DSM 70398

Şekil 4.18’de verilen mekanizmanın ilk basamağı olan yükseltgenme tepkimesi enzim kaynağı olarak *R. glutinis* mikroorganizması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizmada da hücre içi enzimler olan ADH ve NADH oksidaz enzimlerinin hücre içinden çıkarak tepkimeleri katalizleyebilmeleri için hücrelere SÖD (% 10 w/v hücre derişimindeki üreme ortamında/tampon ortamında 4 dk (pulse:1s +1s)) ve mekanik parçalama (% 10 w/v hücre derişimindeki üreme ortamında/ tampon ortamında 4 kez (45 s uygulama+15 s ara)) yöntemleri uygulanmıştır. Bununla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle de tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Hücre üreme ortamında ve fosfat tamponunda (pH 7) gerçekleştirilen bu tepkimelerin sonuçları sırasıyla şekil 4.24 ve şekil 4.25’te verilmiştir. Fakat % ee değerlerinin çok düşük olması tepkimenin stereoseçimli olarak gerçekleşmediğini göstermektedir.



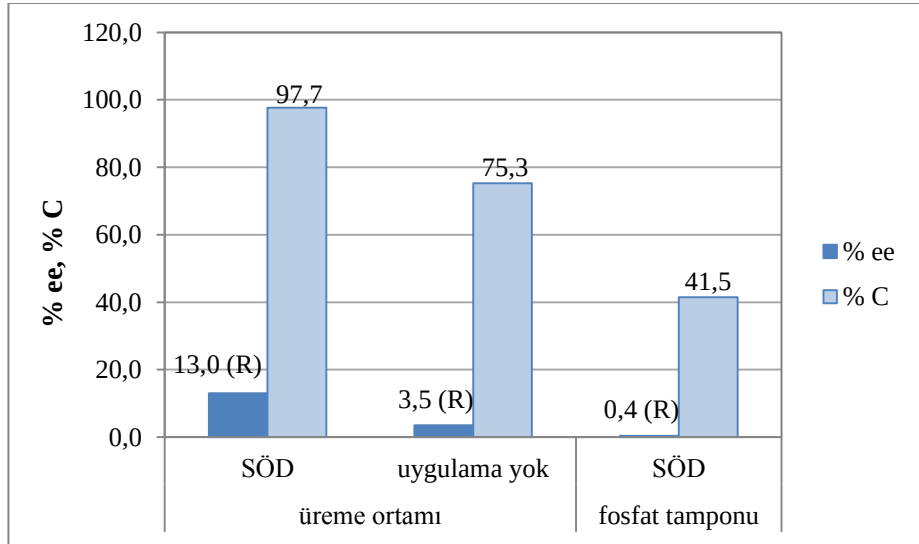
Şekil 4.24 *R. glutinis* ile rasemik propranololün üreme ortamında yükseltgenmesine parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. glutinis* = 100 g/L, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında** 4 dk (pulse:1s+1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında** 4 kez (45s uygulama+ 15s ara), Süre = 5 gün, $T=30$ °C)



Şekil 4.25 *R. glutinis* ile rasemik propranololün tampon ortamında yükseltgenmesine parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. glutinis* = 100 g/L, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 4 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 4 kez (45s uygulama+ 15s ara), Süre = 5 gün, $T=30$ °C)

4.2.2.3 *Lactobacillus brevis*

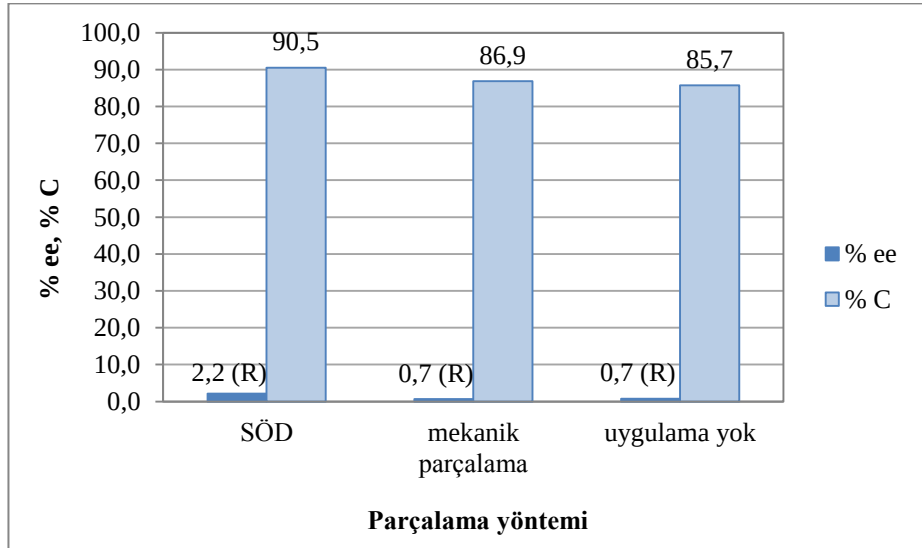
Aynı şekilde, rasemik propranololün yükseltgenme tepkimesi *L. brevis* mikroorganizması ile gerçekleştirilmiştir. ADH ve NADH oksidaz enzim kaynağı olarak kullanılan bu mikroorganizmada da enzimlerin hücre içinden çıkarak ADH enzimi katalizörlüğünde yükseltgenme tepkimesini, NADH oksidaz enzimi katalizörlüğünde de kofaktör rejenerasyonu tepkimesini katalizleyebilmeleri için (Şekil 4.18) hücrelere SÖD yöntemi uygulanmıştır. Bununla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle de üreme ortamında bir tepkime gerçekleştirilmiştir. Hücre üreme ortamında ve fosfat tamponunda (pH 7) gerçekleştirilen bu tepkimelerin sonuçları şekil 4.26’da verilmiştir. Üreme ortamında SÖD uygulandığında nispeten iyi bir sonuç (% 13 ee) elde edilmiştir. Tampon ortamında % ee çok düşük iken, üreme ortamında az da olsa daha yüksek % ee elde edilmesinin hücre üreme ortamında bulunan kofaktörlerin SÖD ile ortama çıkan enzimlerle şekil 4.18’de görülen kofaktör rejenerasyonu döngüsünü gerçekleştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca üreme ortamında gerçekleştirilen tepkimelerde % C değerlerinin fosfat tamponunda gerçekleştirilen tepkimeye göre daha yüksek olmasının da bundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



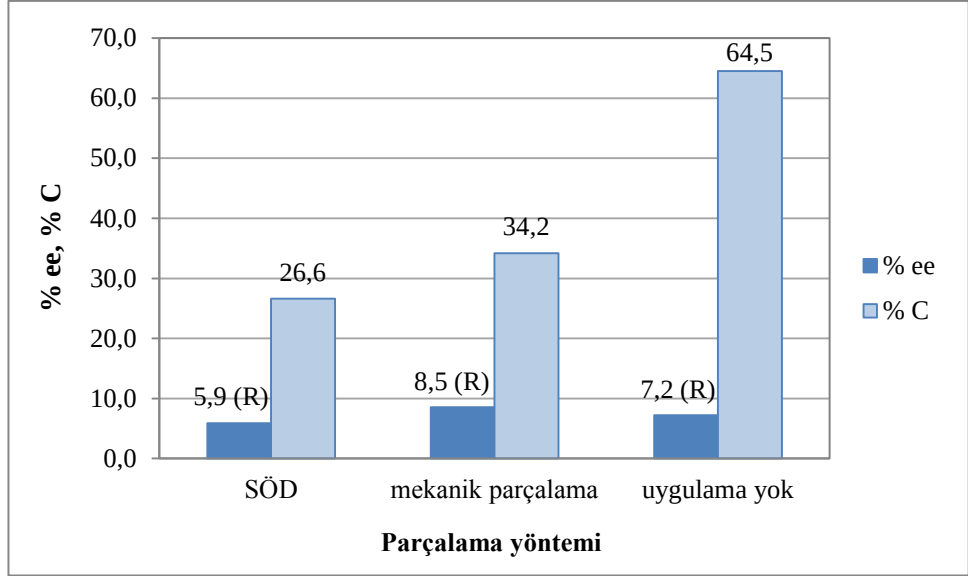
Şekil 4.26 *L. brevis* ile rasemik propranololün yükseltgenmesine SÖD ve tepkime ortamının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *L. brevis* = 50 g/L, % 5 w/v hücre derişimindeki üreme ortamında/tampon ortamında 2 dk SÖD (pulse:1s +1s), Süre = 4 gün, $T=30$ °C)

4.2.2.4 *Rhizopus arrhizus*

Damle vd. (2000) çalışmasında *Rhizopus arrhizus* NCIM 997 ve *Geotrichum candidum* NCIM 980 ile rasemik propranololün biyotransformasyonunu gerçekleştirmiş ve S-propranololü sırasıyla % 88 ve % 78 ee ile elde etmişlerdir. Bu bilgiye istinaden Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen *R. arrhizus* ile rasemik propranololün derasemizasyonu gerçekleştirilmiştir. *R. arrhizus* iki farklı besiyerinde üretilmiş ve tepkimelerde kullanılmıştır. İlk olarak Bölüm 3.2.1.2.3'te bileşimi verilen PDB ortamında (Çizelge 3.7) üretildikten sonra topaklanarak üreyen mikroorganizmanın tepkimede iç kütle aktarım kısıtlamalarını azaltmak için, hücreler SÖD ve mekanik parçalamayla parçalanmıştır. Bununla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle de tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Hücre üreme ortamında ve fosfat tamponunda (pH 7) gerçekleştirilen bu tepkimelerin sonuçları sırasıyla şekil 4.27'de ve şekil 4.28'de verilmiştir. Buna göre, üreme ortamında % C değerleri daha yüksek olmasına rağmen % ee değerleri oldukça düşüktür. Tampon ortamında üreme ortamına göre daha yüksek % ee değerleri elde edilmiştir fakat değerler yine de düşüktür.

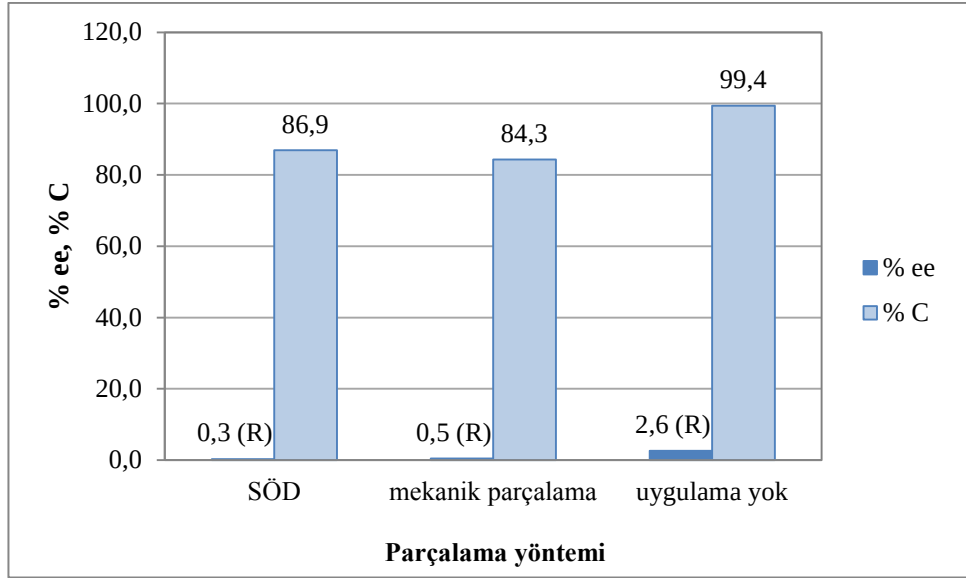


Şekil 4.27 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün üreme ortamında (PDB) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus*= 100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki **üreme ort. (PDB)** 7 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ort. (PDB)** 3 kez (45s uygulama+ 15s ara), Süre = 6 gün, $T=30$ °C)

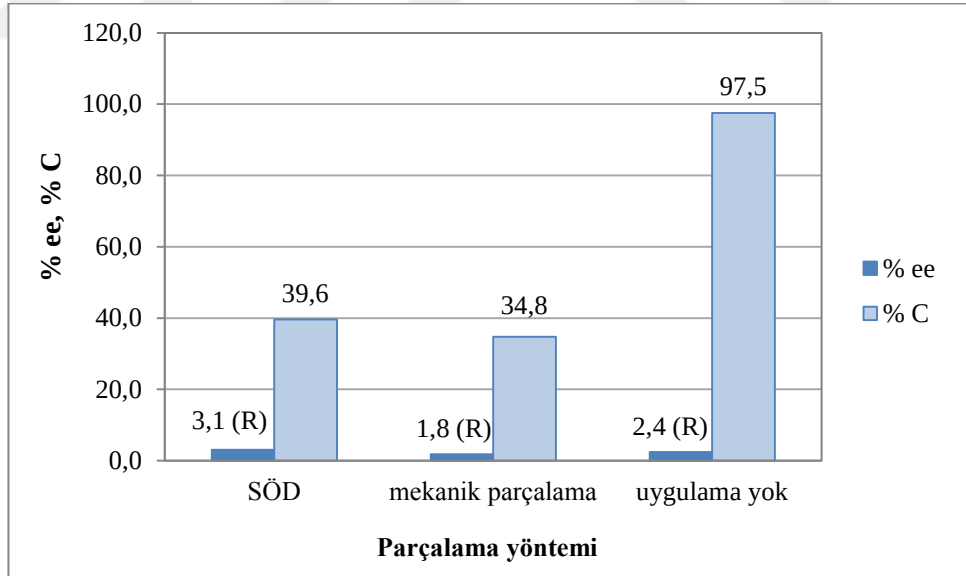


Şekil 4.28 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus*= 100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 7 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 3 kez (45s uygulama+ 15s ara), Süre = 6 gün, $T=30$ °C)

PDB üreme ortamında üretilen hücrelerle düşük % ee değerleri bulunduğundan hücreler bir de bileşimi Bölüm 3.2.1.3.3, çizelge 3.8’de belirtilen Damle vd. (2000) çalışmasındaki hücre üreme ortamında üretilmiştir. Bu hücrelerle, üreme ortamında ve tampon ortamında (fosfat tamponu, pH 7) tepkimeler gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlar sırasıyla şekil 4.29 ve şekil 4.30’da verilmiştir. Elde edilen % ee değerleri beklendiğinin aksine çok düşüktür. Üreme ortamında % C değerleri tampon ortamına göre daha yüksektir. Bunun, üreme ortamında bulunan kofaktör ve kosubstratların daha fazla olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Tampon ortamında üreme ortamına göre daha yüksek % ee değerleri elde edilmiştir fakat değerler yine de düşüktür.

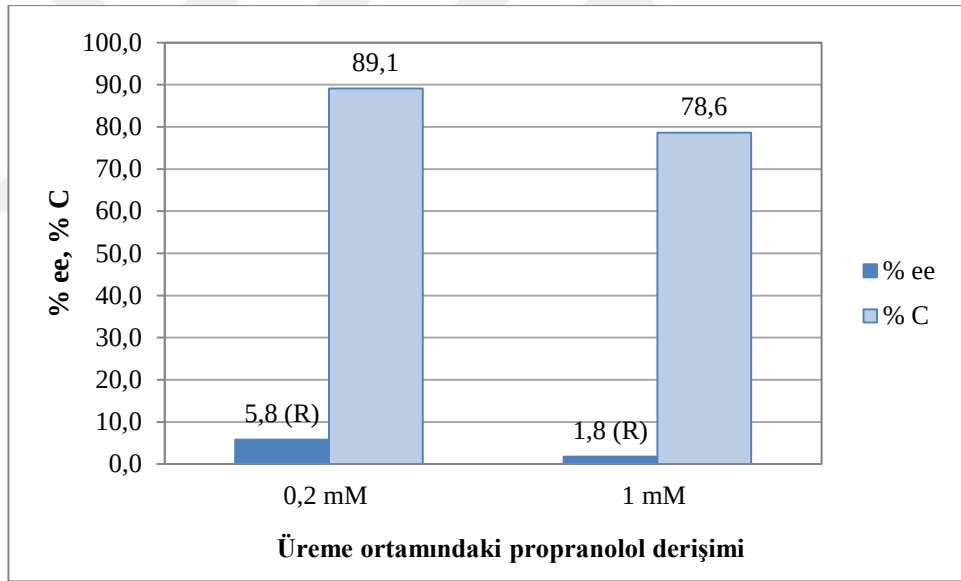


Şekil 4.29 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün üreme ortamında (Damle vd. 2000) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus* = 100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında (Damle vd. 2000)** 7 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında (Damle vd. 2000)** 2 kez (45s uygulama+ 1dk ara), Süre = 4 gün, $T=30$ °C, KH=170 rpm)

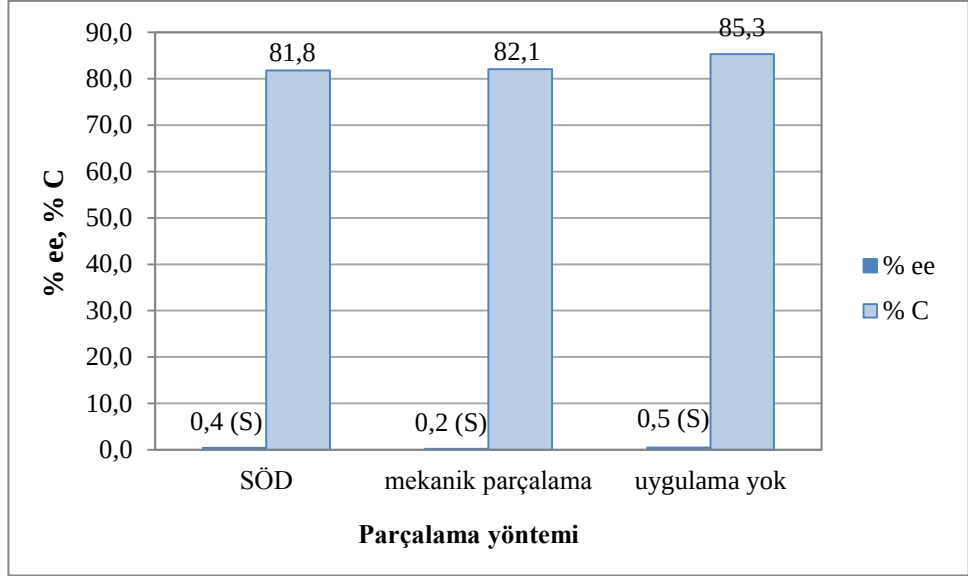


Şekil 4.30 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus* = 100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 7 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 2 kez (45s uygulama+ 1dk ara), Süre = 4 gün, $T=30$ °C, KH=170 rpm)

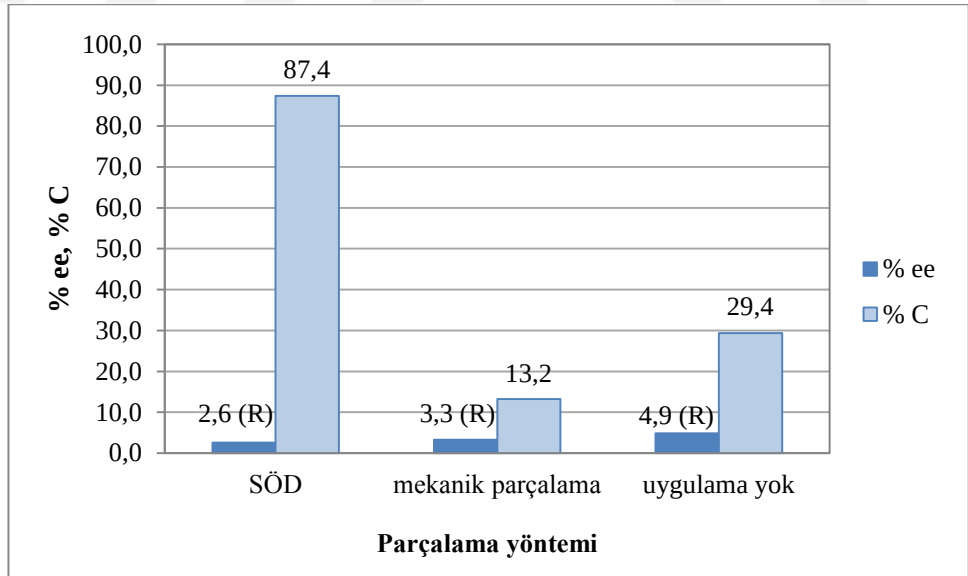
Ayrıca, hücre ürerken substrata alışması amacıyla hücre üreme ortamına bir miktar rasemik propranolol (iki farklı derişimde) koyularak üremesi sağlanmıştır. Hücre bu koşullarda üredikten sonra ortamdan diğer tepkimelerde kullanılan oranda hücre ve ortam, örnek alınarak analizlenmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.31’de verilmiştir. Görüldüğü gibi, hücre üreme ortamına substratın katılması da, % ee değerlerinde önemli bir değişiklik oluşturmamıştır. Bunun yanında bir de 0.2 mM propranolol içeren üreme ortamında üreyen hücreler farklı parçalama yöntemleriyle parçalanıp tepkimede kullanılmıştır. Hücre üreme ortamı ve tampon ortamında (fosfat tamponu, pH 7) gerçekleştirilen tepkimelerde elde edilen sonuçlar sırasıyla şekil 4.32 ve şekil 4.33’te verilmiştir. Bu durumda da sonuçlarda bir değişiklik olmamıştır. Tampon ortamında üreme ortamına göre daha yüksek % ee değerleri elde edilmiş fakat % ee değerleri yine de oldukça düşüktür.



Şekil 4.31 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün derasemizasyonuna üreme ortamına katılan propranolol etkisi (V=10 mL, *R. arrhizus* = 100 g/L, Süre = 2 gün, T=30 °C)



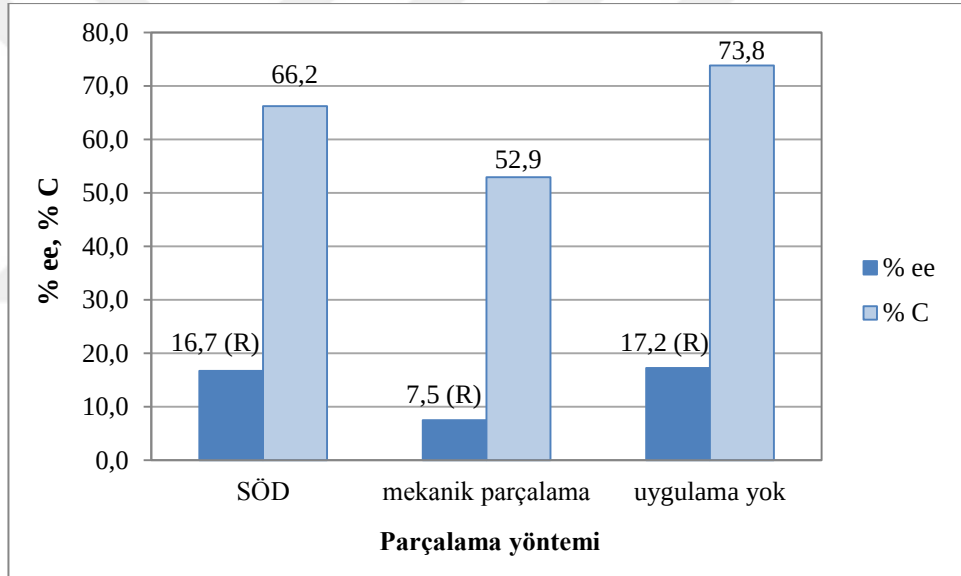
Şekil 4.32 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün üreme ortamında (Damle vd. (2000)+propranolol) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus* = 100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında (Damle vd. (2000)+propranolol)** 7 dk (pulse:1s+1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında (Damle vd. (2000)+propranolol)** 45s uygulama, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=200 rpm)



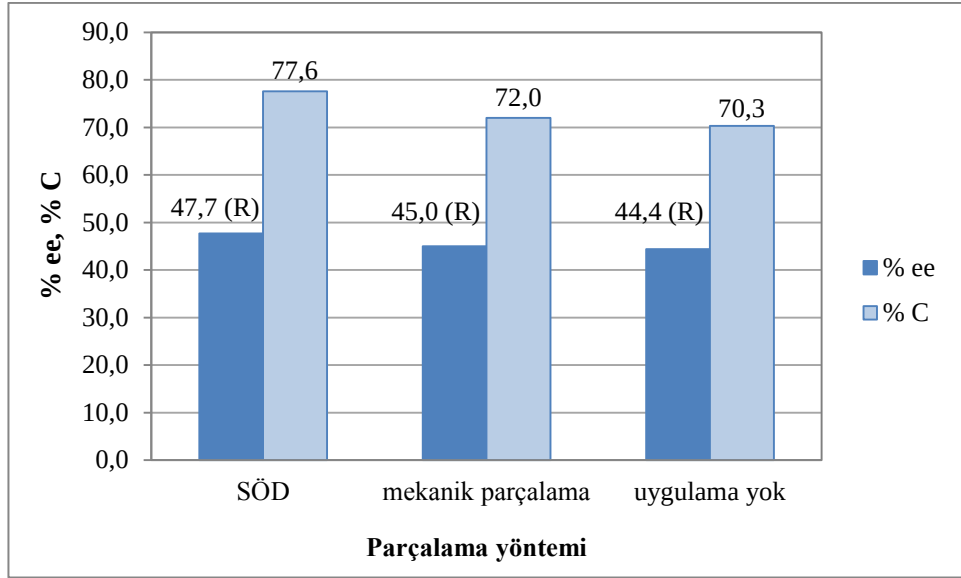
Şekil 4.33 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus* = 100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 7 dk (pulse:1s+1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 45s uygulama, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=200 rpm)

4.2.2.5 *Rhizopus oryzae* CBS 111718

Benzer şekilde *R. oryzae* da iki farklı besiyerinde üretilmiş ve rasemik propranololün derasemizasyonu tepkimelerinde kullanılmıştır. İlk olarak Bölüm 3.2.1.2.3'te bileşimi verilen üreme ortamında (Çizelge 3.6) üretildikten sonra topaklanarak üreyen mikroorganizmanın tepkimede iç kütle aktarım kısıtlamalarını azaltmak için hücreler SÖD ve mekanik parçalamayla parçalanmıştır. Bununla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle de tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Hücre üreme ortamında ve fosfat tamponunda (pH 7) gerçekleştirilen bu tepkimelerin sonuçları sırasıyla şekil 4.34 ve şekil 4.35'de verilmiştir.



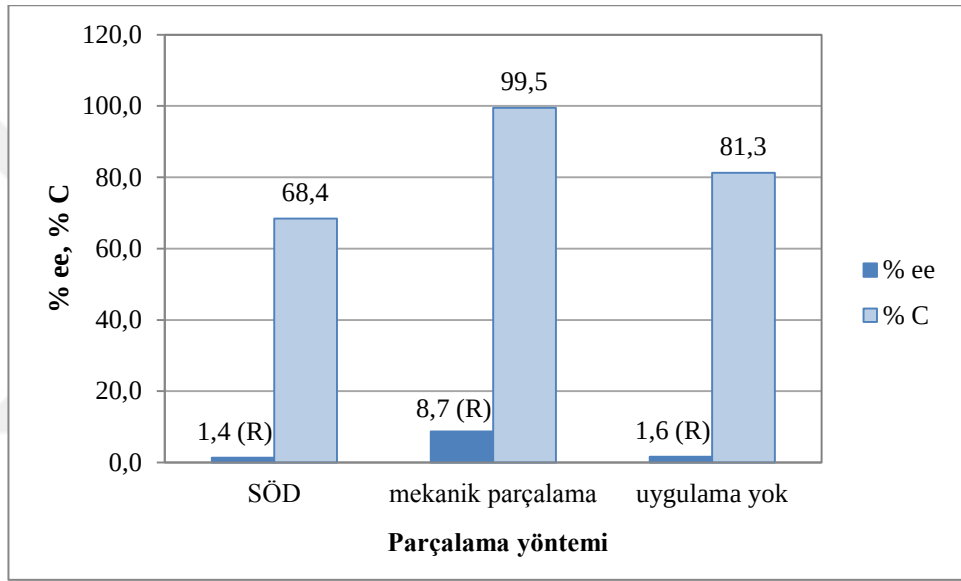
Şekil 4.34 *R. oryzae* ile rasemik propranololün üreme ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında** 10 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında** 45s uygulama, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=200 rpm)



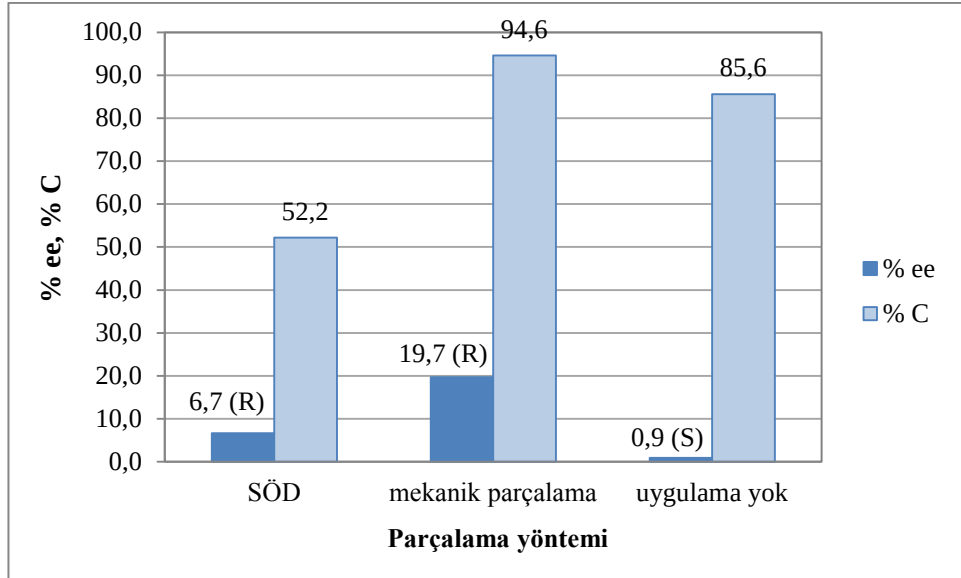
Şekil 4.35 *R. oryzae* ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 10 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 45s uygulama, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=200 rpm)

Buna göre, bu mikroorganizma ile elde edilen % ee değerleri denenen tüm mikroorganizmalardan daha yüksektir ve umut vadetmektedir. Farklı parçalama yöntemleri ile parçalanmış hücrelerle elde edilen % ee değerleri birbirine yakın olarak bulunmuştur. Fakat en yüksek % ee değeri hücreye tampon ortamında SÖD uygulandığı durumda % 47.7 (% C=77.6) olarak elde edilmiştir. Tüm parçalama yöntemlerinde tampon ortamında üreme ortamına göre daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeninin, üreme ortamında bulunan başka hücre dışı enzimlerin farklı tepkimeleri katalizleyerek farklı dönüşümler gerçekleştirmesi olduğu düşünülmektedir. Üreme ortamındaki tepkimelerde % ee değerlerinin bu yüzden düşük olduğu düşünülmüştür. Cardus vd. (2004) çalışmalarında bir amidoalkol olan rasemik N-(1-hidroksi-1-feniletıl) benzamid'in *Cunninghamella echinulata* NRRL1384 mikroorganizması (tüm hücre) ile mikrobiyal derasemizasyonuyla R-enantiyomerinin üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada da, biyotransformasyon üremiş hücrelerle tampon ortamında gerçekleştirildiğinde üremekte olan hücrelerle elde edilen sonuçlara göre daha yüksek verimle gerçekleşmiştir. Bunun sebebi ise üremekte olan hücrelerle biyotransformasyonda hücre dışı enzim aktivitesinin verimleri düşürdüğü şeklinde açıklanmıştır.

Bir de, *R. oryzae* PDB ortamında üretilerek tepkime gerçekleştirilmiştir. Bu ortamda da topaklanarak üreyen mikroorganizmanın yine SÖD ve mekanik parçalamayla parçalanmıştır. Bununla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle de tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Hücre üreme ortamında ve fosfat tamponunda (pH 7) gerçekleştirilen bu tepkimelerin sonuçları ise sırasıyla şekil 4.36 ve şekil 4.37’de verilmiştir. Görüldüğü gibi % ee değerleri yine düşük bulunmuştur. Bu durum enzim kaynağı olarak kullanılan mikroorganizmaların üreme ortamlarının bileşimlerinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.36 *R. oryzae* ile rasemik propranololün üreme ortamında (PDB) derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_o=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında (PDB)** 7 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **üreme ortamında (PDB)** 3 kez (45s uygulama+ 1 dk ara), Süre = 6 gün, $T=30$ °C, $KH=170$ rpm)



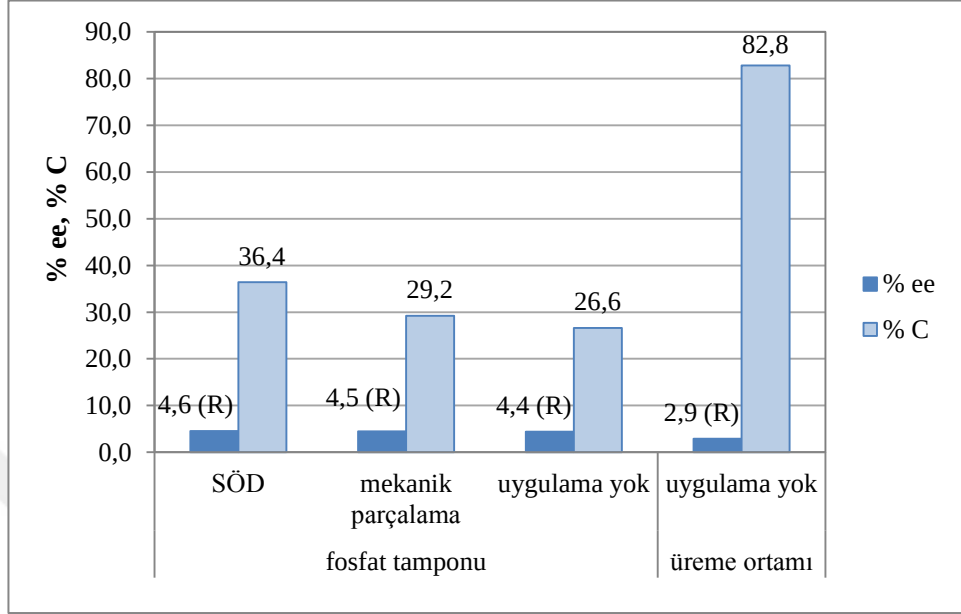
Şekil 4.37 *R. oryzae* ile rasemik propranololün tampon ortamında derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*=100 g/L, SÖD=% 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 7 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 10 w/v hücre derişimindeki **tampon ortamında** 3 kez (45s uygulama+1 dk ara), Süre=6 gün, $T=30$ °C, KH=170 rpm)

4.2.2.6 *Rhizopus arrhizus* NCIM 997

Konuyla ilgili literatürde bulunan tek çalışma olan Damle vd. (2000) çalışmalarında, rasemik propranololün biyotransformasyonunu *Rhizopus arrhizus* NCIM 997 ve *Geotrichum candidum* NCIM 980 mikroorganizmaları ile gerçekleştirerek S-propranololü sırasıyla % 88 ve % 78 ee ile elde etmişlerdir. Bu nedenle bu mikroorganizmalar temin edilerek tepkimelerde kullanılmıştır. *Rhizopus arrhizus*, Damle vd. (2000) çalışmasındaki üreme ortamında üretilmiş ve tepkimeler çalışmadaki tepkime koşullarında ($V=76$ mL, *R. arrhizus*=132 g/L, $C_0=4.4$ mM, tampon ortamında) gerçekleştirildiğinde beklenenin aksine % ee=4.5; % C=32.9 olarak elde edilmiştir.

Ayrıca diğer tüm hücreler denenirken tepkimelerin gerçekleştirildiği koşullarda da (3 mM substrat derişimi, 100 g/L hücre derişimi, 10 mL tepkime hacmi) denemeler yapılmıştır. Bunun için hücreler SÖD uygulanarak ve mekanik parçalama ile

parçalanmış ve hiçbir uygulama yapılmadan da kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.38’de verilmiştir. Görüldüğü gibi; elde edilen % ee değerleri yine çok düşüktür.

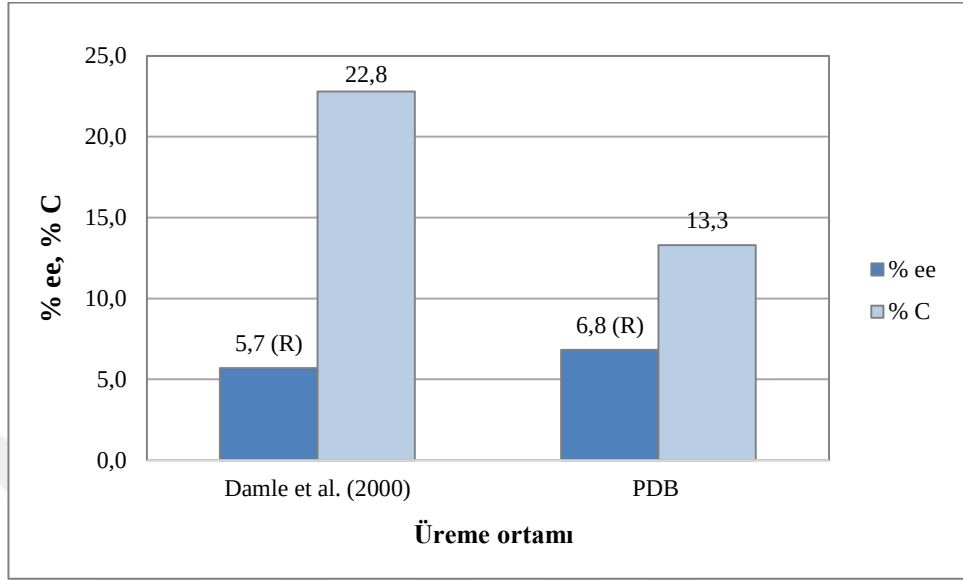


Şekil 4.38 *R. arrhizus* ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yöntemi ve tepkime ortamının etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus*= 100 g/L, SÖD= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 45 s uygulama, pH=7, Süre=6 gün, $T=30$ °C)

Ayrıca, çalışma kapsamında ticari olarak ‘propranolol HCl’ adıyla temin edilen substrattan HCl kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılarak ‘propranolol’ elde edilmiş, Damle vd. (2000) çalışmasında belirtildiği gibi bütanolde çözülmüştür. *Rhizopus arrhizus*, çalışmadaki üreme ortamında üretilmiş ve tepkimeler çalışmadaki tepkime koşullarında ($V=76$ mL, *R. arrhizus*=132 g/L, $C_0=5$ mM, fosfat tamponunda) gerçekleştirildiğinde beklenenin aksine % ee=1.57 (% C=26.6) olarak elde edilmiştir.

Mikroorganizmaların üreme ortamları oluşacak olan enzimler üzerinde çok etkili olduğundan *R. arrhizus* mikroorganizması Bölüm 3.2.1.6.3’te belirtilen iki farklı sıvı üreme ortamında üretilerek tepkimede kullanılmıştır. Bu tepkimeler 3 mM substrat derişimi, 100 g/L hücre derişimi, 10 mL tepkime hacmi koşullarında gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.39’da verilmiştir. Buna göre, iki ortamda üretilen

hücrelerle de elde edilen % ee değerleri düşüktür. Fakat makalede belirtilen üreme ortamında üretilen hücrelerle daha yüksek % C değeri elde edilmiştir.



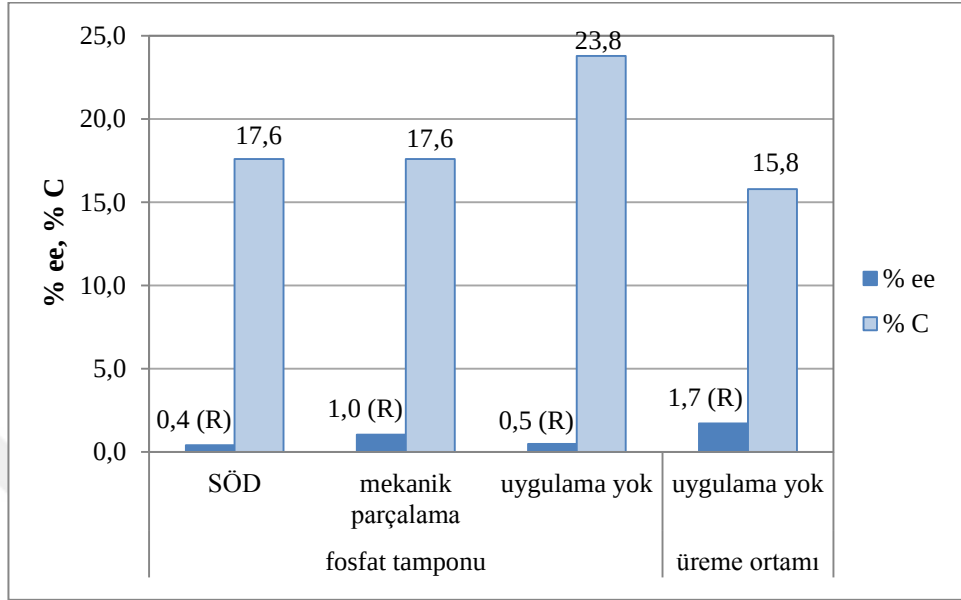
Şekil 4.39 *R. arrhizus* sıvı üreme ortamının rasemik propranololün derasemizasyonuna etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. arrhizus*= 100 g/L, pH=7, Süre = 5.5 gün, $T=30$ °C)

4.2.2.7 *Geotrichum candidum* NCIM 980

Rhizopus arrhizus NCIM 997 gibi *Geotrichum candidum* NCIM 980 mikroorganizması da Damle vd. (2000) çalışmasındaki üreme ortamında üretilmiş ve tepkimeler çalışmadaki tepkime koşullarında ($V=76$ mL, *G. candidum*=132 g/L, $C_0=4.4$ mM, fosfat tamponunda) gerçekleştirildiğinde beklenenin aksine % ee=1.1 (% C=30.2) elde edilmiştir.

Ayrıca bu hücre ile de diğer tüm hücreler denenirken tepkimelerin gerçekleştirildiği koşullarda da (3 mM substrat derişimi, 100 g/L hücre derişimi, 10 mL tepkime hacmi) deneyler yapılmıştır. Bunun için hücreler SÖD uygulanarak ve mekanik parçalama ile parçalanmış ve hiç bir uygulama yapılmadan da kullanılmıştır. Tepkime bir de üreme ortamında, hücreye hiç bir uygulama yapılmadan gerçekleştirilmiştir. Elde edilen

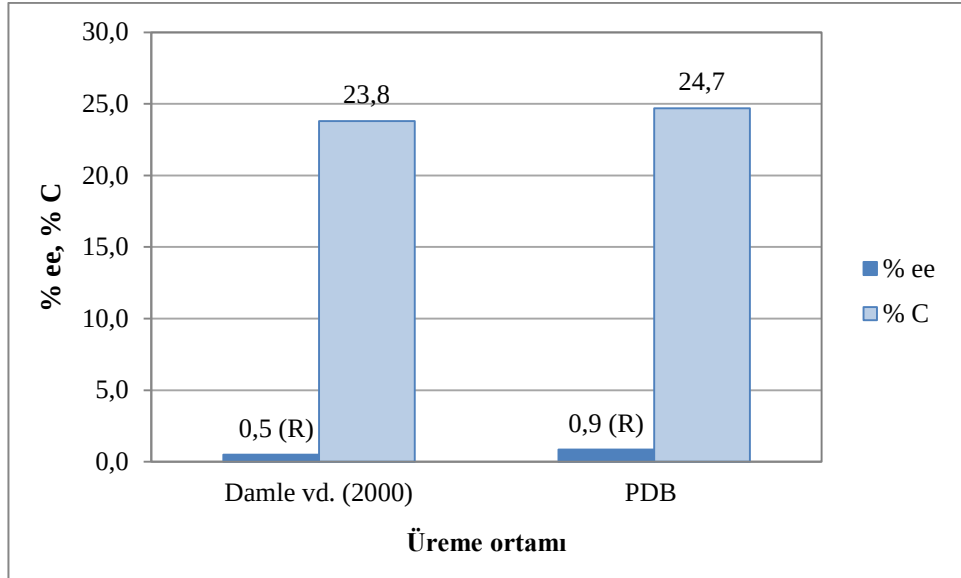
sonuçlar Şekil 4.40’da verilmiştir. Buna göre bu mikroorganizmanın da tepkimeyi stereoseçimli olarak katalizleyemediği anlaşılmıştır.



Şekil 4.40 *G. candidum* ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yöntemi ve tepkime ortamının etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *G. candidum*=100 g/L, SD= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 dk (pulse: 1s +1s), Mekanik paralama= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 45 s uygulama, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$  C)

Hücre bir de PDB reme ortamında üretilerek tepkimede kullanılmıştır ve Damle vd. (2000) alışmasındaki ortamda üretilen hücrelerle karşılaştırılması Şekil 4.41’te verilmiştir. Buna göre iki ortamda üretilen hücrelerle de benzer % ee ve % C değerleri elde edilmiştir. Dolayısıyla *G. candidum* tepkimeyi seçimli olarak katalizlememektedir.

Bunların haricinde, çalışma kapsamında ticari olarak ‘propranolol HCl’ adıyla temin edilen substrattan HCl kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılarak ‘propranolol’ elde edilmiş, Damle vd. (2000) alışmasında belirtildiği gibi bütanolde çözülerek tepkimede kullanılmıştır. *G. candidum* mikroorganizması da çalışmadaki üreme ortamında üretilmiş ve tepkimeler çalışmadaki tepkime koşullarında ($V=76$ mL, *G. candidum*=132 g/L, $C_0=5$ mM, fosfat tamponunda) gerçekleştirildiğinde beklenenin aksine % ee=1.31 (% C=31.8) elde edilmiştir.



Şekil 4.41 *G. candidum* sıvı üreme ortamının rasemik propranololün derasemizasyonuna etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *G. candidum*= 100 g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C)

Sonuç olarak, rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu için uygun mikroorganizmanın bulunabilmesi amacıyla farklı türdeki mikroorganizmalar tepkimede kullanılmış, elde edilen sonuçlar incelenmiştir. Buna göre; en yüksek % ee, bir küf mantarı olan *Rhizopus oryzae* CBS 111718 mikroorganizması kullanılarak elde edildiğinden tepkimelere bu mikroorganizma ile devam edilmesine karar verilmiştir.

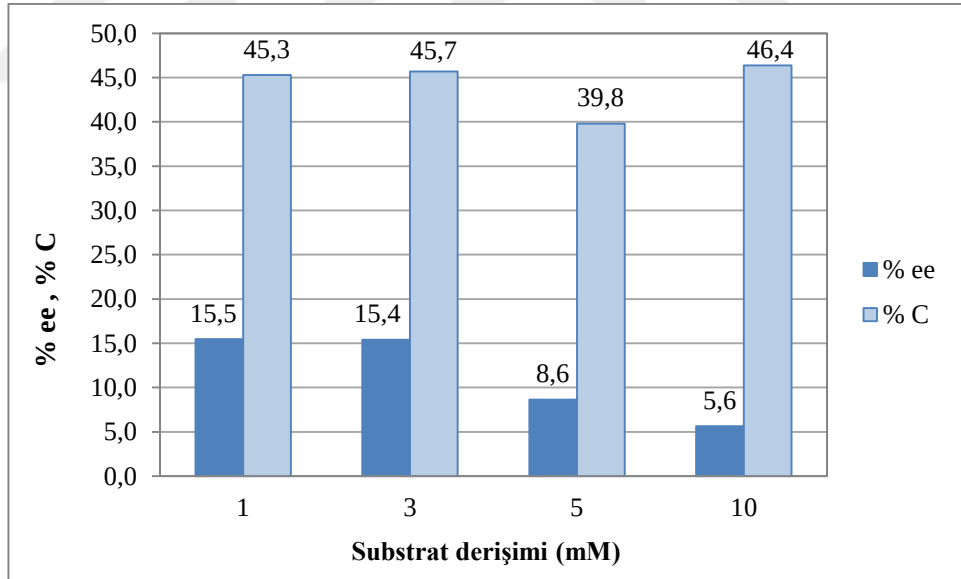
4.2.3 *Rhizopus oryzae* CBS 111718 ile tepkime parametrelerinin belirlenmesi

4.2.3.1 SÖD uygulamalı

R. oryzae mikroorganizmasındaki enzimlerin rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonunu stereoseçimli olarak katalizlediğinden emin olunduktan sonra en uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha önce *R. oryzae* ile gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre; üreme ortamı ve tampon ortamında gerçekleştirilen ve parçalama yöntemlerinin etkisinin incelendiği deneylerde (Şekil 4.34 - 4.35) tampon ortamında daha yüksek % ee değerleri elde edildiğinden tepkimelerin tamponda gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bunun yanında tampon ortamında

farklı hücre parçalama yöntemlerinde yakın değerler elde edilse de en yüksek % ee değeri SÖD uygulaması ile elde edildiğinden sonraki deneylerde hücelere SÖD uygulanmıştır. En uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesi için substrat derişimi, tepkime süresi, tepkime ortamının pH'ı, SÖD uygulama süresi gibi farklı parametrelerin tepkimeye etkileri incelenmiştir. Yapılan bu deneylerden elde edilen sonuçlar sırasıyla verilmiştir.

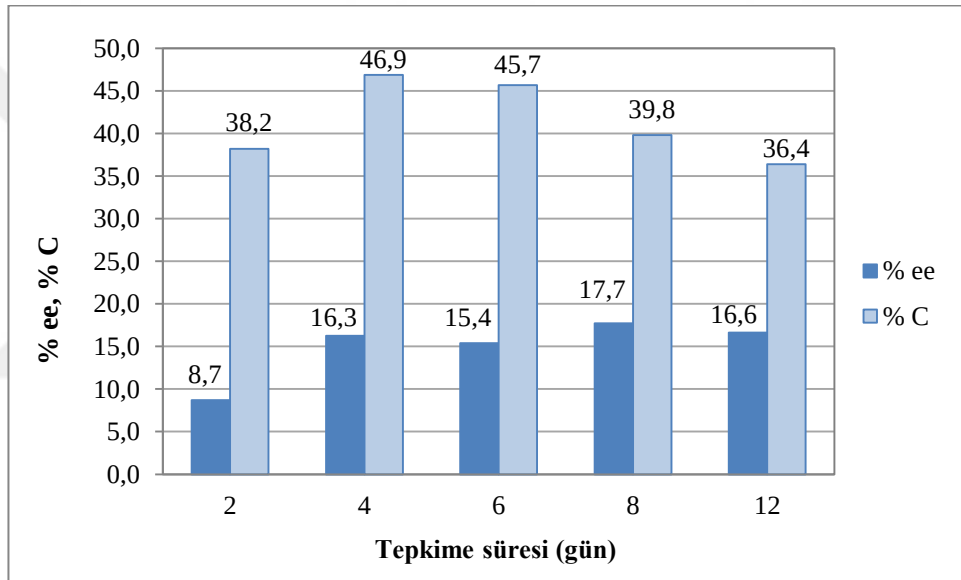
Substrat derişimi tepkime için çok önemli bir parametre olduğundan substrat derişiminin tepkimeye etkisi incelenmiş (1, 3, 5, 10 mM) ve elde edilen sonuçlar şekil 4.42'de verilmiştir. Buna göre, 1 ve 3 mM substrat derişiminde birbirine yakın % ee ve % C değerleri elde edilmiş, substrat derişimi arttıkça % ee değerinin azaldığı gözlenmiştir. Endüstriyel açıdan düşünüldüğünde üretilen madde miktarının fazla olması istenmektedir. Bu nedenle daha yüksek substrat derişimi olan 3 mM derişiminde çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.42 Substrat derişiminin etkisi (*R. oryzae*=100 g/L, V=10 mL, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 5 dk (pulse:1s +1s), pH=6, Süre= 6 gün)

Bu mikroorganizma ile gerçekleştirilen önceki deneylerde tepkime süresi 6 gün idi. Fakat zamanla enantiyomerik aşırılığın nasıl değiştiğini anlayabilmek için tepkime

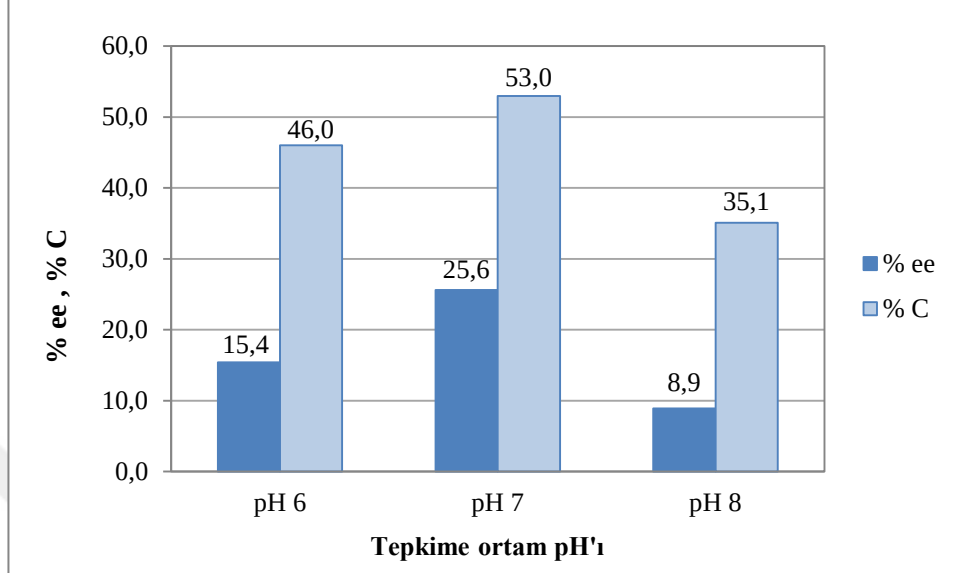
süresinin etkisi incelenmiştir. Aynı koşullarda başlatılan tepkimeler farklı sürelerde sonlandırılarak elde edilen sonuçlar şekil 4.43'te görülmektedir. Buna göre; 2 gün bu tepkime için yeterli bir süre değildir. % ee değerinde 2. günden sonra artış devam etmektedir. 4. günden sonra % ee değerinde fazla bir değişiklik olmamakla beraber, 8. güne kadar hafif bir artış olduğu gözlenmiştir. Buna göre, bu tepkime sistemi için 6 gün tepkime süresinde çalışılmasına karar verilmiştir. Damle vd. (2000) çalışmasında da bir küf mantarı olan *Rhizopus arrhizus* mikroorganizması ile gerçekleştirilen tepkimelerde zamanla % ee değerinin değişimi incelendiğinde en uygun tepkime süresinin 6 gün olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.43 Tepkime süresinin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 5 dk (pulse:1s +1s), pH=6)

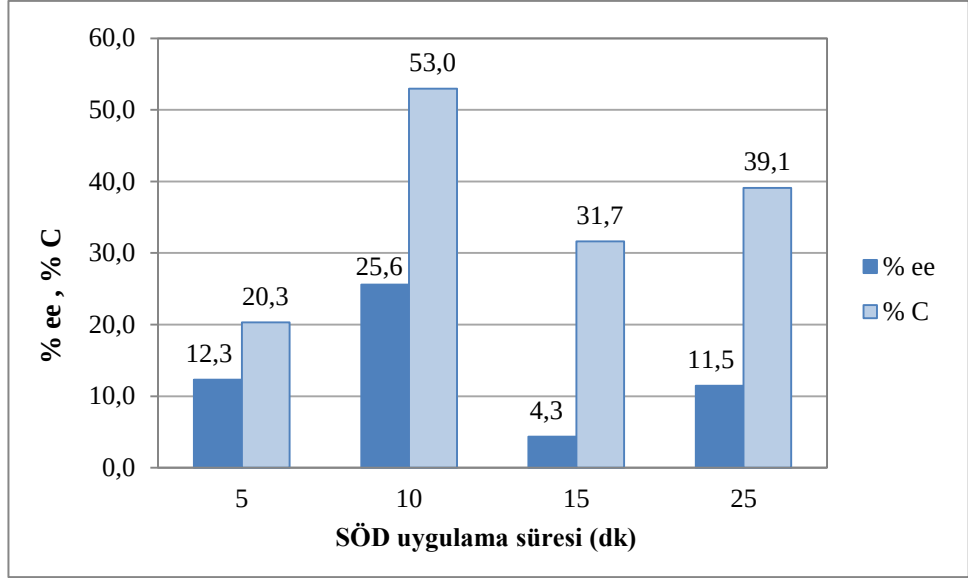
Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için pH önemli bir parametredir. Tampon ortamında gerçekleştirilen tepkimelerde pH etkisini görebilmek amacıyla tepkimeler pH 6, 7, 8 olmak üzere üç farklı pH'ta gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.44'te verilmiştir. Buna göre, en yüksek % ee ve % C değerleri sırasıyla % 25.6 ve % 53 olarak pH 7'da elde edilmiş ve sonraki deneylerin bu pH'taki tampon ortamında gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu konudaki tek çalışma olan Damle vd. (2000) çalışmasında da bir küf mantarı olan *Rhizopus arrhizus* mikroorganizması ile gerçekleştirilen tepkimelerde pH etkisi (pH 6.8; 7.0; 7.4) incelenmiş ve en yüksek % ee

değeri pH 7’de bulunmuştur. Bu açıdan elde edilen sonucun literatürle uyumlu olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.44 Tepkimedeki fosfat tamponunun pH’ının etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 dk (pulse:1s +1s), Süre= 6 gün)

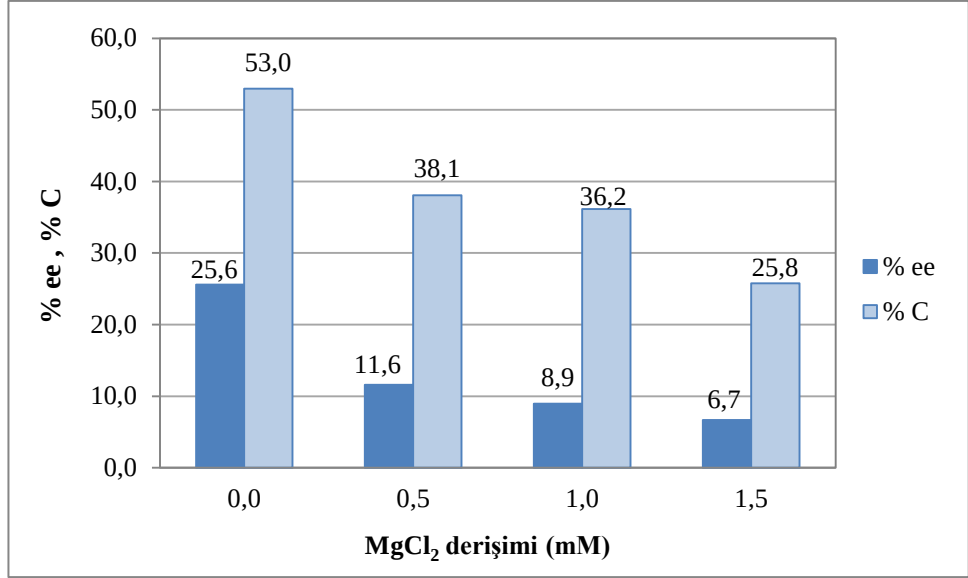
Topaklanarak üreyen hücreye, tepkimedeki iç kütle aktarım kısıtlamalarının azaltılması için ses ötesi dalga uygulanmaktadır. Fakat bu sırada hücreye enerji uygulandığından, enzim aktivitesinin düşmemesi için SÖD uygulama süresinin önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle hücreye SÖD uygulama süresinin etkisi incelenmiştir. 40 W güçteki 20 kHz SÖD, 1s uygulama+1s ara olacak şekilde 5, 10, 15 ve 25 dk hücrelere uygulanmıştır. SÖD uygulanırken mikroorganizmanın bulunduğu beher, uygulama sırasında artan sıcaklığın enzim aktivitesini düşürmemesi için buz banyosuna oturtulmuştur. Elde edilen sonuçlar şekil 4.45’te görülmektedir. Buna göre, 5 dk SÖD uygulaması hücreyi parçalamak için yeterli olmamıştır. En yüksek % ee ve % C değerleri hücreler 10 dk SÖD ile parçalandığında elde edilmiştir. SÖD uygulama süresi arttığında ise % ee değerlerinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebinin, 10 dakikadan fazla SÖD uygulandığında uygulanan enerjinin enzimin yapısına olumsuz etki yapması olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.45 SÖD uygulama süresinin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L, SÖD= % 10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında (pulse:1s +1s), pH=7, Süre= 6 gün)

Kofaktörler enzimin katalitik aktivitesini artırmak ve tepkime süresini kısaltmak için kullanılırlar. Bu nedenle, bazı enzimlerin aktivitesi üzerine olumlu etkiler yapan +2 değerlikli iyonlardan Mg'un etkisini görebilmek için tepkime ortamına farklı derişimlerde $MgCl_2$ eklenmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.46'da verilmiştir. Fakat burada beklenenin aksine tepkime ortamındaki $MgCl_2$ derişimi arttıkça enantiyomerik aşırılık değeri düşmüştür. Hiç eklenmediği durumda % ee ve % C değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

R. oryzae ile elde edilen sonuçların tümü R konfigürasyonuna aittir. Buna göre *R. oryzae*'nın S-seçimli davranarak S-propranolölü dönüştürdüğü ve bu nedenle R-propranolölün daha fazla miktarda elde edildiği düşünülmektedir.



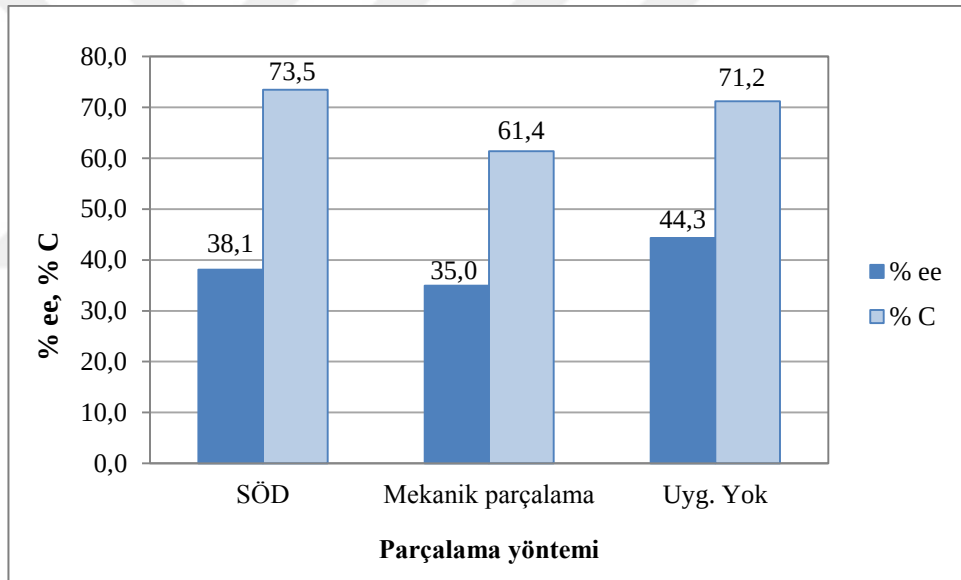
Şekil 4.46 MgCl₂ derişiminin etkisi (C₀=3 mM, V=10 mL, *R. oryzae*=100 g/L, SÖD= %10 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 dk (pulse:1s +1s), pH=7, Süre= 6 gün)

Daha önce denenen tüm mikroorganizmalara göre *R. oryzae* ile iyi sonuçlar elde edilebilmiştir. Fakat zamanla *R. oryzae* mikroorganizmasının aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Bu sorunun giderilmesi için çalışmalar yapılmıştır.

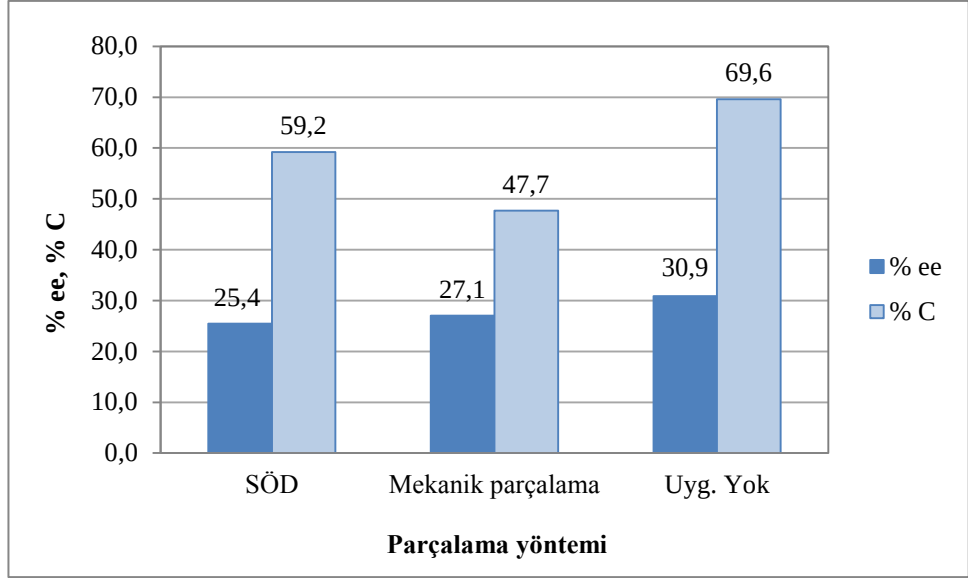
4.2.3.2 SÖD uygulamasız

Rhizopus oryzae CBS 111718 mikroorganizmasının aktivitesinde düşüş olduğu anlaşıldığından bu mikroorganizma kültür koleksiyonundan tekrar temin edilmiştir. Çalışmanın ilerleyen kısımlarında yeni mikroorganizmanın da aktivitesinin düşme ihtimaline karşı mikroorganizma, glikozlu malt ekstrakt agar ortamı (önceki gibi, çizelge 3.4'te verilen bileşimdeki ortamda) ve glikozsuz malt ekstrakt agar ortamında (kültür koleksiyonunun önerdiği ortam, çizelge 3.5'te verilen bileşimdeki ortamda) açılmış ve aynı ortamlarda aktarımına devam edilmiştir. Her iki ortamda üretilen hücrelerden spor çözeltisi hazırlanarak çizelge 3.6'da bileşimi verilen, önceki sıvı üreme ortamına ekim yapılarak hücreler çoğaltılmıştır. Farklı katı üreme ortamlarında üretilen hücrelerle elde edilecek sonuçların önceki verilerle karşılaştırılabilmesi için tepkimeler aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Topaklanarak üreyen mikroorganizmanın

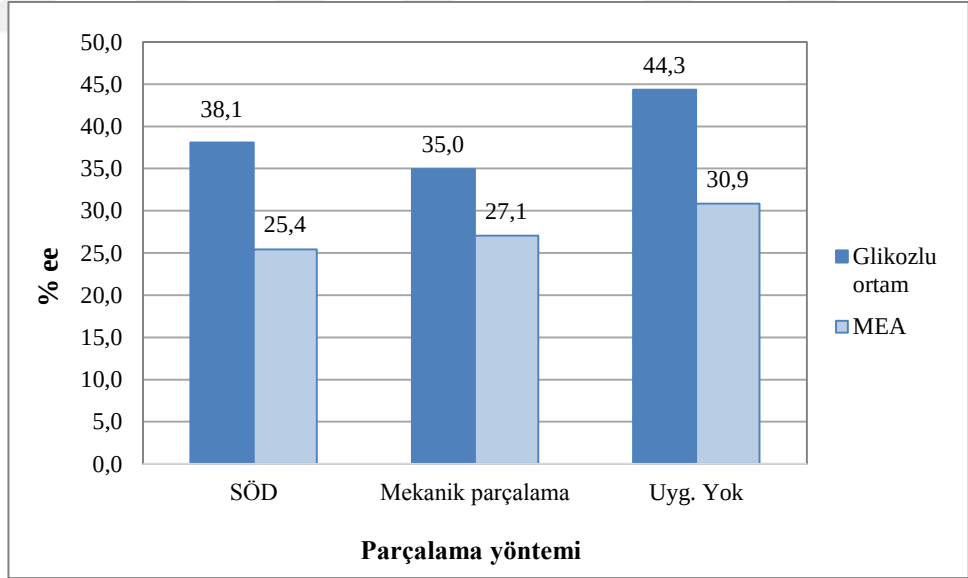
tepkimede iç kütle aktarım kısıtlamalarını azaltmak için hücreler SÖD ve mekanik parçalamayla parçalanmış, bununla birlikte hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerle de tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Böylece aynı zamanda önceki tepkimelerde olduğu gibi mikroorganizmayı parçalama yönteminin etkisi de araştırılmıştır. Önceki deneylerde fosfat tamponunda (pH 7) gerçekleştirilen tepkimelerde hücre üreme ortamında gerçekleştirilen tepkimelere göre daha yüksek sonuçlar elde edildiğinden tepkimeler fosfat tamponunda (pH 7) gerçekleştirilmiştir. Glikozlu malt ekstrakt agar (MEA) ve glikozsuz malt ekstrakt agar ortamında üretilen hücrelerle farklı parçalama yöntemlerinin etkisi incelendiğinde elde edilen sonuçlar sırasıyla şekil 4.47 ve şekil 4.48’de verilmiştir. Bu iki katı üreme ortamı kullanılarak elde edilen % ee değerlerinin karşılaştırması da şekil 4.49’da verilmiştir.



Şekil 4.47 **Glikozlu MEA**’da üretilen *R. oryzae* ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, SÖD= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 45s uygulama, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=190 rpm)



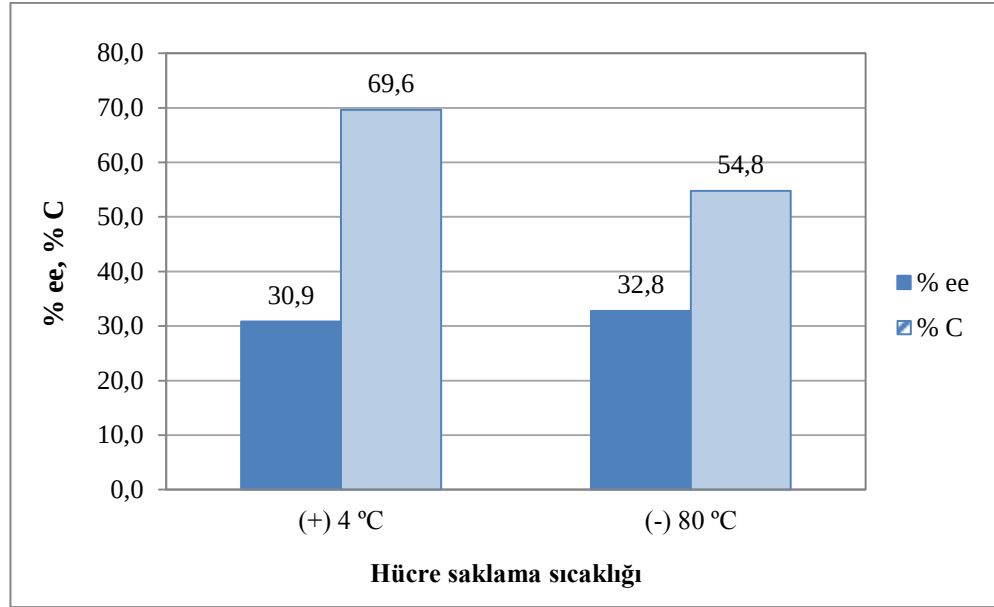
Şekil 4.48 **Glikozsuz MEA**'da üretilen *R. oryzae* ile rasemik propranololün derasemizasyonuna parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, SÖD= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 45s uygulama, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=190 rpm)



Şekil 4.49 **Glikozlu ve glikozsuz MEA**'da üretilen *R. oryzae* ile rasemik propranololün derasemizasyonuna katı üreme ortamı ve parçalama yönteminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, SÖD= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 10 dk (pulse:1s +1s), Mekanik parçalama= % 11 w/v hücre derişimindeki tampon ortamında 45s uygulama, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=190 rpm)

Buna göre; *R. oryzae* mikroorganizması daha önceden olduğu gibi glikozlu MEA katı üreme ortamında üretildiğinde tüm uygulama türleri için daha yüksek % ee ve % C değerleri elde edilmiştir. Bunun yanında parçalama yöntemleri karşılaştırıldığında ise glikozlu MEA katı üreme ortamında üretilen hücrelerle yapılan deneylerde, en yüksek % ee değerleri; hücrelere hiçbir uygulama yapılmadan tepkimede kullanıldığında % 44.3 ve SÖD uygulandığında % 38.1 olarak elde edilmiştir. Her iki durumda da yakın değerler elde edildiğinden sonraki deneylerde ilave bir işlem olmaması açısından hücrelere uygulama yapılmadan tepkimede kullanılmalarına karar verilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda çalışmanın devamında *R. oryzae* mikroorganizmasının glikozlu MEA katı üreme ortamında çoğaltılmasına karar verilmiştir.

Ayrıca, çalışma sırasında katı üreme ortamında üretilmiş olan mikroorganizma +4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmekte ve o ortamdan aktarım yapılarak üretilip tepkimelerde kullanılmaktadır. Çalışmanın ilerleyen kısımlarında yeni mikroorganizmanın da aktivitesinin düşme ihtimaline karşı mikroorganizmanın -80 °C’de stoklanması denenmiştir. Bunun için bir miktar mikroorganizma eğik agar ortamında (MEA ortamında) üretilerek -80 °C’ye koyulmuştur. -80 °C’de bir hafta durduktan sonra alınıp katı ortamda canlandırılmış ve tepkimede kullanılmıştır. Bunun sonucunda +4°C’de bekleyen mikroorganizmalar ile % ee 30.9 bulunurken, -80°C’de 1 hafta bekleyen mikroorganizmalar ile % ee 32.8 bulunmuştur (Şekil 4.50). Görüldüğü gibi birbirine yakın değerler bulunduğundan bu mikroorganizmanın -80 °C’de stoklanabileceği düşünülmektedir.



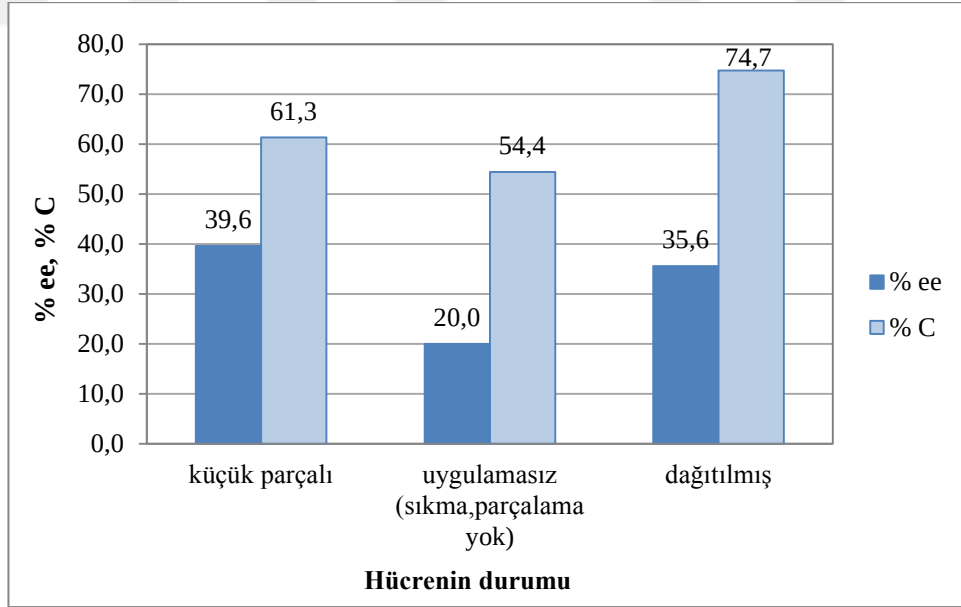
Şekil 4.50 Glikozsuz MEA'daki *R. oryzae*'nin stoklama sıcaklığının rasemik propranololün derasemizasyonuna etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*=100 g/L, pH=7, Süre=6 gün, $T=30$ °C, KH=200 rpm)

Yeni mikroorganizma ile elde edilen sonuçlar eski verilerle birebir aynı olmasa da yakın olduğu düşünülmektedir. Bu durum tespit edildikten sonra *R. oryzae* mikroorganizması ile tepkimenin yüksek % ee ve % C ile gerçekleşmesi için tepkimeye etki eden parametrelerin (mikroorganizmanın parçalanma durumu, hücre derişimi, substrat derişimi, karıştırma hızı, sıvı üreme ortamının pH'ı gibi) etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu deneylerden elde edilen sonuçlardan sırasıyla bahsedilecektir.

Şekil 4.49'da görüldüğü gibi hücrelere uygulama yapılmadığı durumda, SÖD uygulandığı duruma göre yakın fakat, daha yüksek % ee değerleri elde edilmiştir. Fakat hücre topaklanarak üremektedir ve bu şekilde tepkimede kullanıldığında iç kütle aktarım kısıtlamalarının olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle hücreler bir cihaz kullanılmadan plastik spatüller yardımıyla kabaca parçalara ayrılarak tepkimede kullanılmış ve hiç uygulama yapılmadığı durumla karşılaştırılmıştır. Şekil 4.51'de görüldüğü üzere hücrelere bir uygulama yapılmadan (sadece sıvı içerisinde biraz dağıtılarak) tepkimede kullanıldığında % ee 35.6 iken, küçük parçalara ayrıldığında ise % 39.6 bulunmuştur. Bu durumda hücreleri parçalara ayırarak iç kütle aktarım

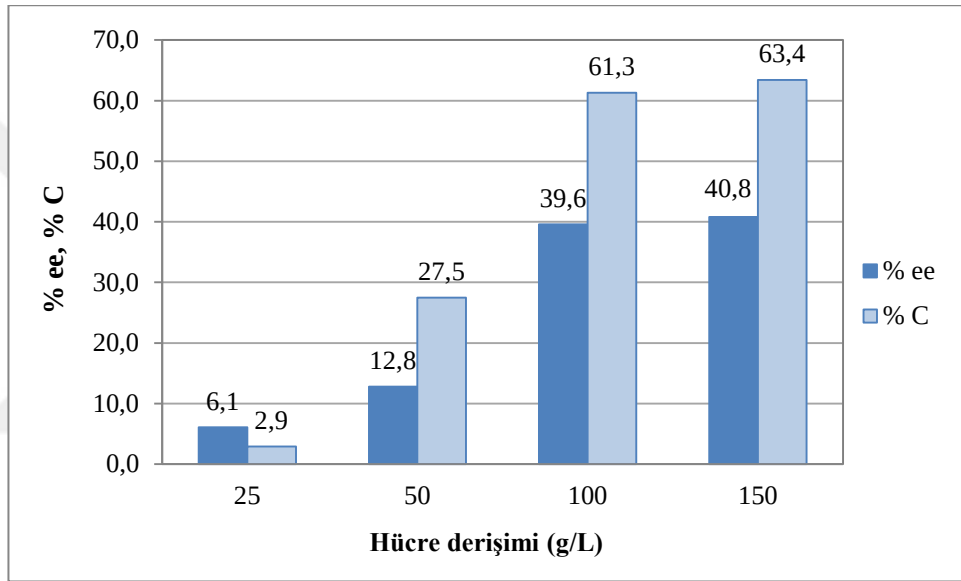
kısıtlamalarının azaltıldığı düşünülmektedir. Sonuç olarak bundan sonra yapılacak deneylerde hücrelerin bu şekilde parçalara ayrılarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Ayrıca deneyler sırasında hücreler süzülerek üreme ortamlarından ayrılmakta, biraz sıkılıp tamponla yıkanmakta, sonrasında tekrar biraz sıkılıp tartılarak tepkimede kullanılmaktadır. Bu şekilde tartılan hücre ağırlığına daha fazla hücre girmesi sağlanmaktadır. Fakat bu sırada yapılan hafif sıkma işleminin hücreye zarar verip vermediğini kontrol etmek amacıyla bir de hücre süzildükten sonra hiç sıkmadan direk tepkimede kullanılmış ve bunun sonucunda daha düşük % ee değeri elde edilmiştir (% 20) (Şekil 4.51). Buna göre hücre ıslak olduğunda tartılan ağırlığa su miktarı da girdiğinden tartılan ağırlıkta enzim miktarı azalmakta, bunun daha düşük % ee'ye sebep olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak yapılan işlemin hücreye zarar vermediği anlaşılmıştır. Mikrobiyal hücreler kullanılarak yapılan deneylerde bu gibi ayrıntıların bile elde edilen sonuçlara ne kadar etki ettiği bu sonuçta da açıkça görülmektedir. Bu da canlı hücrelerle yapılan deneylerdeki tekrarlanabilirlik sorununun bir nedeni olabilir.



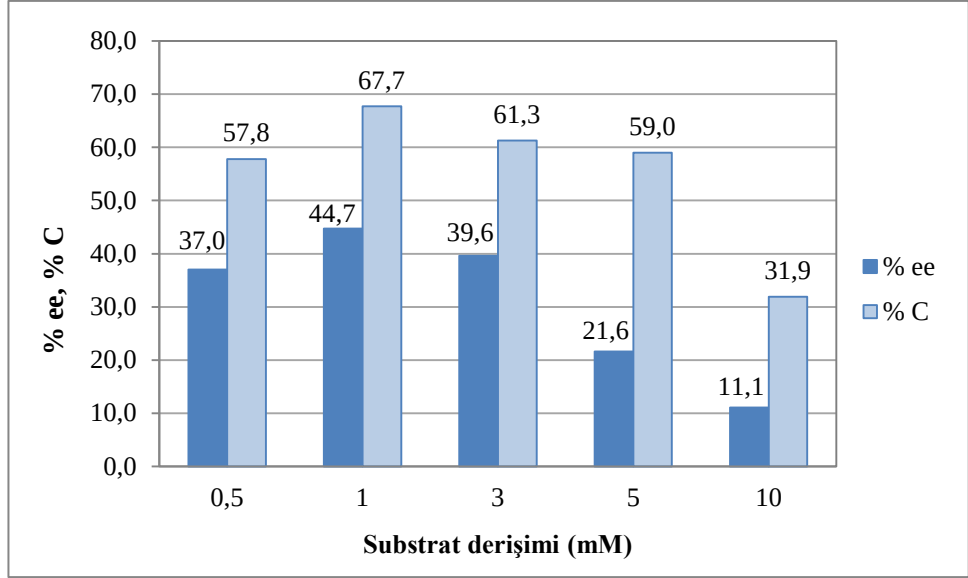
Şekil 4.51 Hücrelerin parçalanma durumunun etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=140 rpm)

Hücre derişimi tepkime için önemli bir parametre olduğundan hücre derişiminin tepkimeye etkisi incelenmiş (25, 50, 100, 150 g/L) ve elde edilen sonuçlar şekil 4.52’de verilmiştir. Buna göre en yüksek % ee değerleri 100 g/L ve 150 g/L hücre derişiminde sırasıyla % 39.6 ve % 40.8 olarak elde edilmiştir. Görüldüğü gibi bu iki derişim değerinde % ee değerleri birbirine çok yakındır. Aynı zamanda % C değerleri de birbirine yakındır. Fakat 150 g/L hücre derişiminde tepkime ortamı çok yoğunlaştığından çalışma zorluğu yaratmıştır. Bu nedenle yüksek sonuç elde edilen 100 g/L derişiminin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



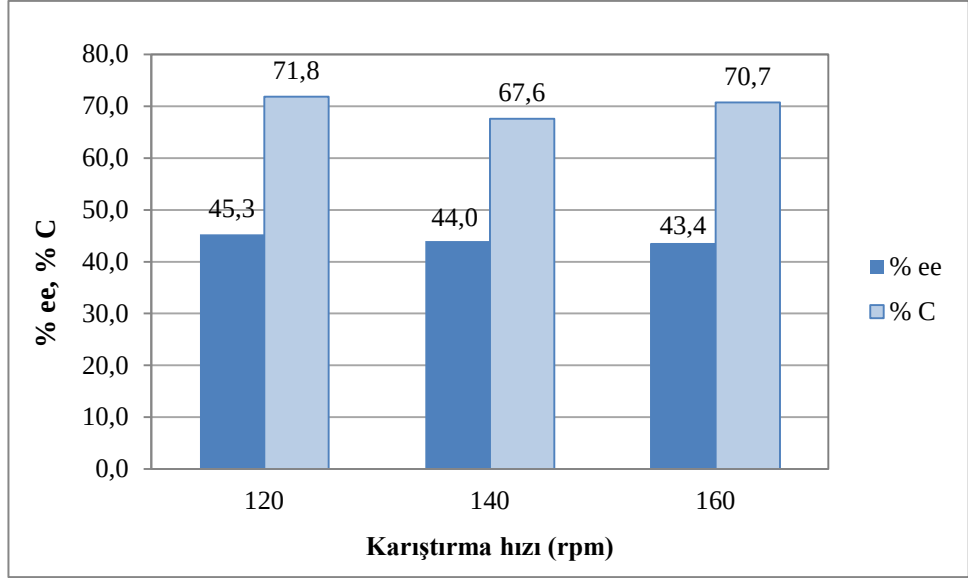
şekil 4.52 Hücre derişiminin etkisi ($C_0=3$ mM, $V=10$ mL, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=140 rpm)

Substrat derişimi de tepkime için çok önemli bir parametre olduğundan substrat derişiminin tepkimeye etkisi incelenmiş (0.5, 1, 3, 5, 10 mM) ve elde edilen sonuçlar şekil 4.53’te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; en yüksek % ee ve % C değerleri sırasıyla % 44.7 ve % 67.7 olarak 1 mM substrat derişiminde elde edilmiştir. 1 mM’ın üzerindeki derişimlerde substrat derişimi arttıka % ee azalmıştır. şimdiye kadar yapılan değerlerde 3 mM substrat derişimi kullanılmakta idi. Bu sonuçlar doğrultusunda bulunan koşullarda (100 g/L hücre derişiminde) 1 mM substrat derişiminin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



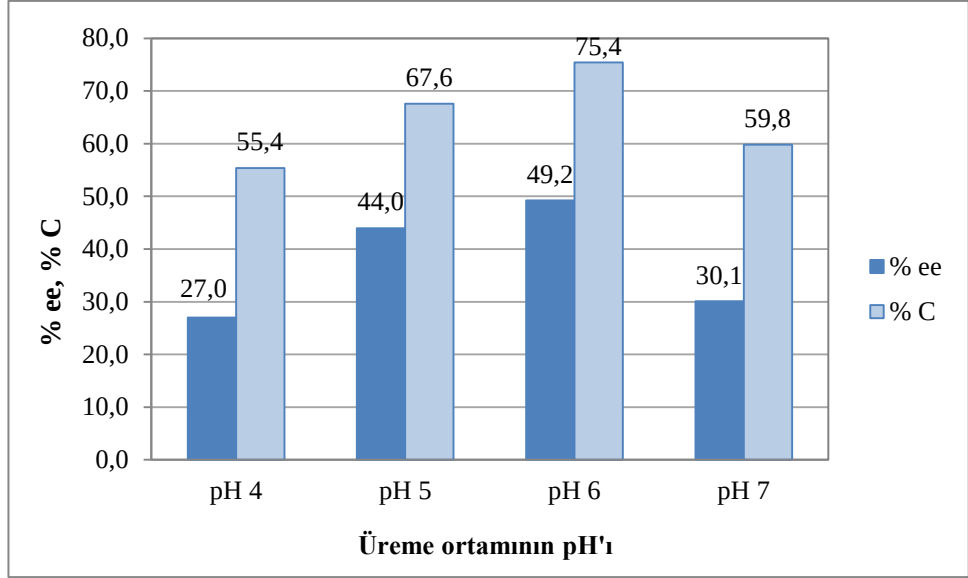
Şekil 4.53 Substrat derişiminin etkisi (*R. oryzae*= 100 g/L, V=10 mL, pH=7, Süre = 6 gün, T=30 °C, KH=140 rpm)

Tepkimelerde karıştırma hızının etkisini görebilmek için tepkimeler 120, 140 ve 160 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.54'te verilmiştir. Genel olarak % ee değerleri birbirine çok yakın olmakla birlikte, karıştırma hızı arttıkça % ee değerinde hafif bir azalma görülmektedir. Karıştırma hızı arttıkça sonuçların artması beklenirken hafif bir azalma görülmesi şaşırtıcı bir sonuçtur. Fakat tepkimeler gerçekleşirken tepkime kaplarına bakıldığında karıştırma hızının yüksek olduğu durumda hücrelerin tepkime kabı içinde yığın halinde çalkalandıkları gözlenmiştir. Karıştırma hızı düşük olan durumda ise hücreler daha dağınık hareket etmektedir. Bu durumda, substrat ile enzimin daha çok etkişebildiği ve bu yüzden az da olsa daha yüksek % ee elde edilebildiği düşünülmektedir.



Şekil 4.54 Karıştırma hızının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C)

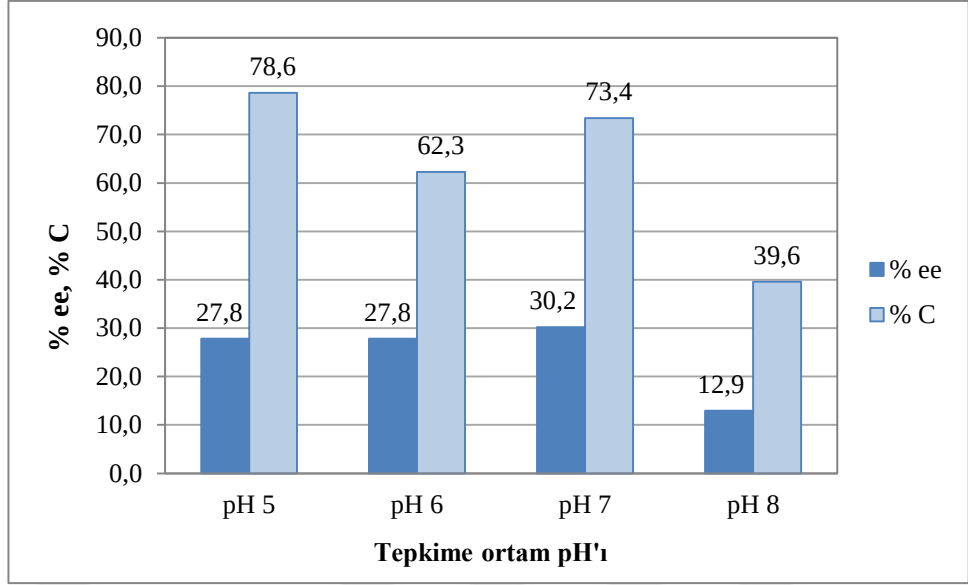
Üreme ortamı hücrenin gerekli enzimleri üretebilmesi için son derece önemlidir. Bu nedenle üreme ortamının pH'ı da tepkimeyi etkileyebilecek önemli bir parametredir. Önceki deneylerde hücreler pH'ı 5 olan üreme ortamında üretilmişti. Farklı pH'lardaki (pH 4, 5, 6, 7) sıvı üreme ortamında üretilen hücreler tepkimede kullanıldığında elde edilen sonuçlar şekil 4.55'de verilmiştir. Buna göre en yüksek % ee ve % C değerleri sırasıyla % 49.2 ve 75.4 olarak pH'ı 6 olan sıvı üreme ortamında üretilen hücrelerle elde edilmiştir ve çalışmanın devamında bu pH değerinde çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.55 Üreme ortamının pH'ının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=140 rpm)

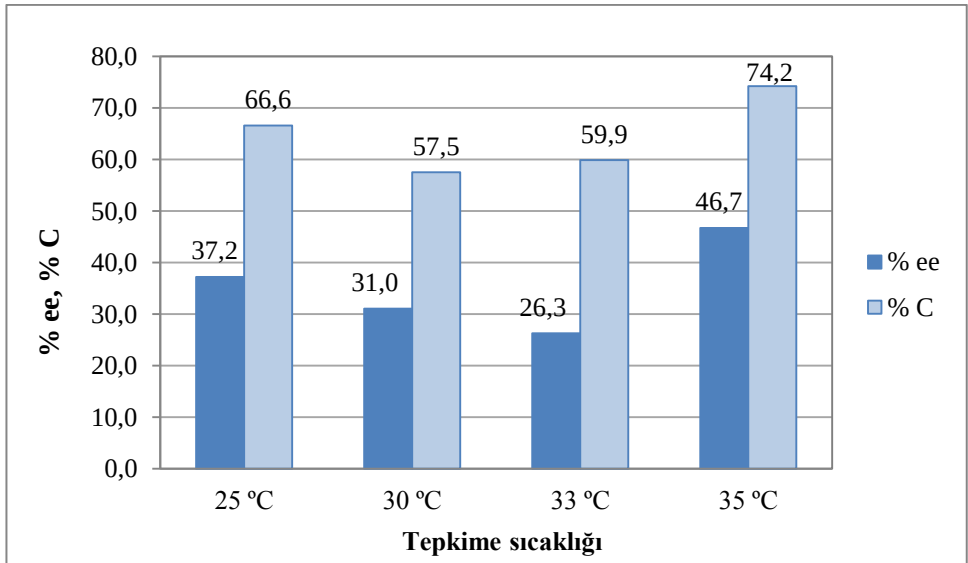
Çalışmanın devamında, en uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesi için farklı tepkime koşulları araştırılmaya devam edilmiştir. Bu kapsamda; tepkime ortamının (fosfat tamponunun) pH'ı, tepkime ortamının sıcaklığı, mikroorganizmanın tamponla yıkanma durumu, farklı spor çözeltileri, farklı tepkime kabı, üreme ortamının sıcaklığı gibi parametrelerin tepkimeye etkisi incelenmiştir.

Önceki bulgulara dayanarak tepkimeler tampon ortamında gerçekleştirilmektedir. Fakat tampon ortamının pH'ının etkisinin anlaşılabilmesi için tepkimeler pH'ı 5, 6, 7, 8 olan fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda elde edilen değerler şekil 4.56'da verilmiştir. Buna göre en yüksek % ee değeri pH 7'de % 30.2 olarak elde edilmiştir. Bununla birlikte pH 5 ve 6'da pH 7'ye yakın % ee değerleri elde edildiği gözlenmiştir. Fakat pH 8'de % ee ve % C açısından önemli ölçüde azalma olduğu anlaşılmıştır. Sonraki deneylerde, en yüksek % ee değeri elde edilen pH 7'de çalışılmasına karar verilmiştir.



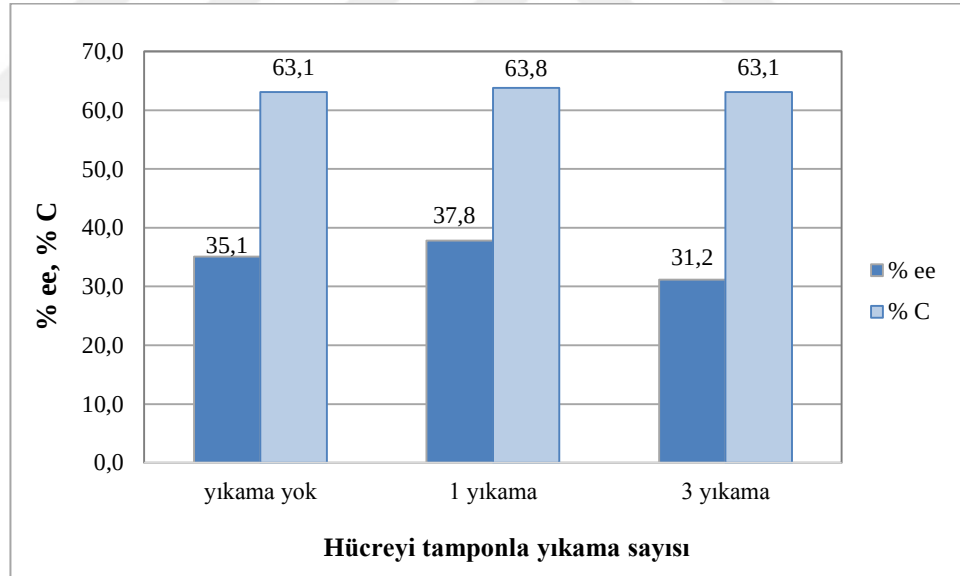
Şekil 4.56 Tepkime ortamının (fosfat tamponunun) pH'ının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, $KH=150$ rpm)

Tepkimeyi etkileyebilecek önemli parametrelerden biri olan sıcaklığın etkisi incelenmiş; tepkime 25, 30, 33, 35 °C sıcaklıklarında gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.57'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek % ee ve % C değerleri tepkime 35 °C'da gerçekleştirildiğinde sırasıyla % 46.7 ve % 74.2 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.57 Tepkime ortamının sıcaklığının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L (30 °C'da üretilmiş), pH=7, Süre = 6 gün, $KH=140$ rpm)

Bunun dışında Damle vd. (2000) çalışmalarında hücrelerin üreme ortamından ayrıldıktan sonra tekrar tekrar yıkandığından bahsettiklerinden, burada da şimdiye kadar yapılan deneylerde olduğu gibi hücreler tamponla 1 defa yıkanarak ve 3 defa yıkanarak, hiç yıkanmadan tepkimede kullanılmış, sonuçların karşılaştırılması şekil 4.58’de verilmiştir. Buna göre hücre tamponla çok yıkandığında % ee değerinin azaldığı görülmektedir. Bu durumun, gerçekleştiği düşünülen mekanizma (Şekil 4.18) ile ilişkili olarak, kofaktör rejenerasyonunun sağlanabilmesi için ortamda bulunan gerekli bileşenlerin yıkama sırasında uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hiç yıkama yapılmadığında ise 1 defa yıkandığı durumla yakın değerler elde edilmekle beraber, hiç yıkanmadığı durumda mikroorganizma tepkime boyunca kümelenme eğilimi göstermiştir. Bu durumun iç kütle aktarım kısıtlamalarına neden olacağı düşünüldüğünden ve % ee ve % C olarak nispeten daha yüksek sonuç elde edildiğinden, hücrelerin tamponla 1 kez yıkandıktan sonra tepkimelerde kullanılmasına karar verilmiştir.

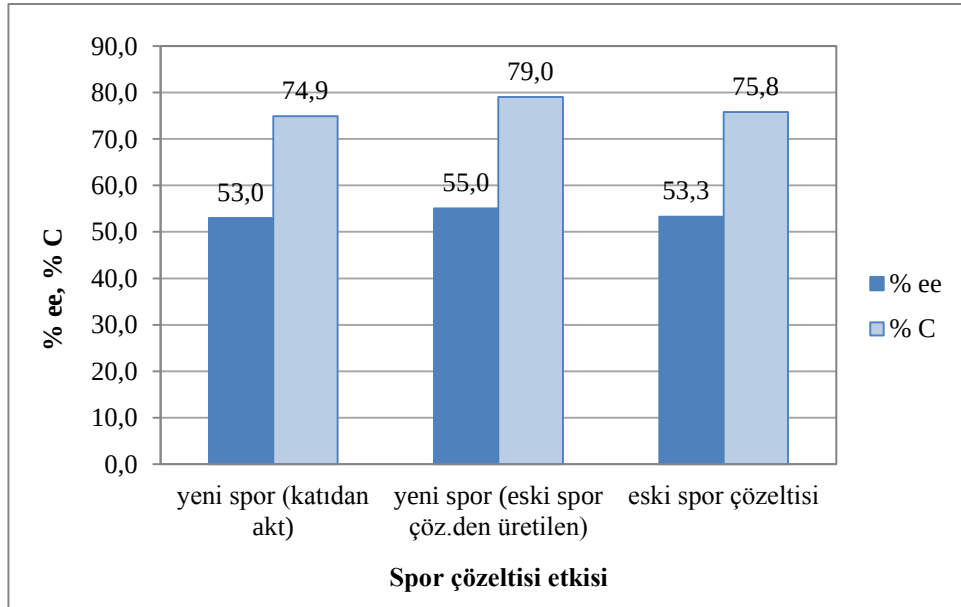


Şekil 4.58 Hücrelerin tamponla yıkanma durumunun etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=120 rpm)

R. oryzae bir küf mantarıdır ve küf mantarları sporla ürer. Sıvı üreme ortamına katı üreme ortamında üremiş sporelerden hazırlanan spor çözeltisinden ekim yapılarak üretilmektedirler. Bu nedenle, hücre üretiminde farklı spor çözeltileri kullanılmasının

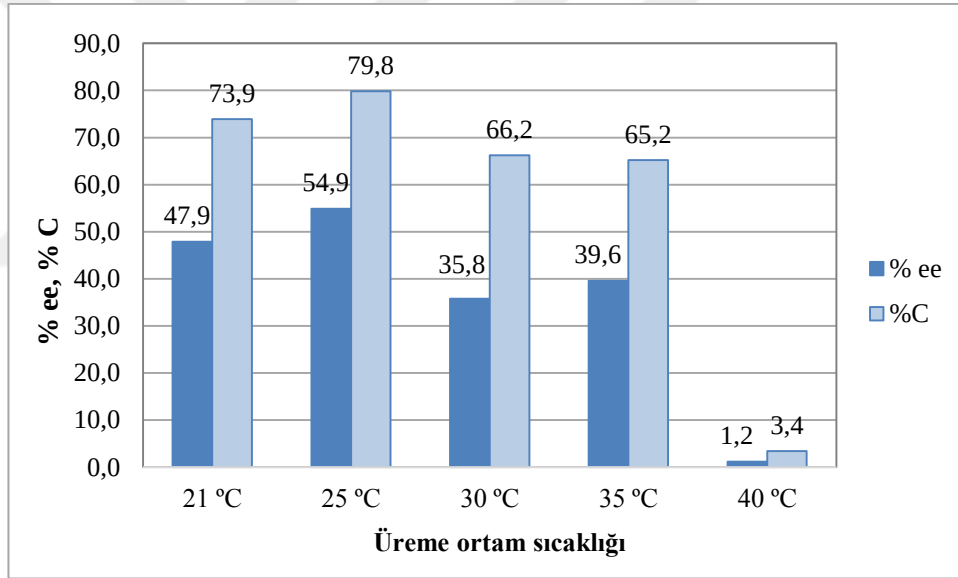
etkisi araştırılmıştır.

Kullanılan spor çözeltilerinden biri her zaman olduğu gibi katıdan katıya aktarım yapılarak çoğaltılan hücrelerden elde edilen spor çözeltisidir ve şekil 4.59’da “yeni spor (katıdan akt.)” ifadesiyle gösterilmiştir. Bu spor kullanıldığı durumda % ee=53, % C=74.9 olarak elde edilmiştir. Bir diğer spor çözeltisi önceki deneylerde tepkimeyi etkileyen parametreler incelenirken kullanılan ve şekilde “eski spor çöz.” olarak ifade edilen spor çözeltisidir. Bu spor çözeltisi ile % ee=53.3, % C=75.8 olarak elde edilmiştir. Bir de, bu spor çözeltisinden taze katı üreme ortamına aktarım yapılarak elde edilen “yeni spor (eski spor çöz.den üretilen)” olarak simgelenen spor çözeltisi kullanılmış ve % ee=55, % C=79 elde edilmiştir. Kullanılan bu üç spor çözeltisi ile de elde edilen % ee ve % C değerleri birbirine çok yakındır. Fakat elde edilen en yüksek değer “yeni spor (eski spor çöz.den üretilen)” olarak simgelenen spor çözeltisi ile % ee=55, % C=79 olarak elde edilmiş ve tepkimelerde bu spor çözeltisinden elde edilen hücrelerin kullanılmasına karar verilmiştir. Sonuçların yakın olmasından spor çözeltisinin elde ediliş yönteminden çok hücrenin yaşının önemli olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.59 Farklı spor çözeltileri kullanılmasının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L, pH=7, Süre = 4 gün, $T=30$ °C, KH=120 rpm)

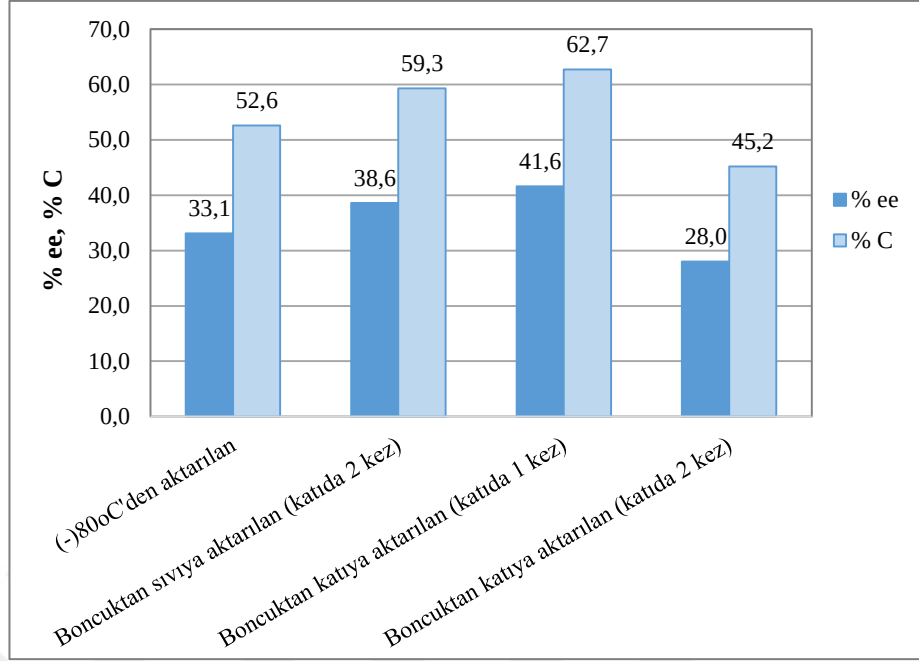
Bunun dışında hücre üreme ortamının sıcaklığının da enzimlerin üretimi açısından çok önemli bir parametre olduğu düşünülerek hücre üreme ortamının sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Bunun için hücreler spor çözeltisinden sıvı üreme ortamına aktarıldıktan sonra farklı sıcaklıklarda (21, 25, 30, 35, 40 °C) üretilmiş ve tepkimede kullanılmışlardır. 25-40 °C haricinde 21 °C’ın araştırılmasının nedeni hücrenin alındığı kültür koleksiyonunun katı ortam üreme sıcaklığını 21 °C olarak önermesidir. Bu sıcaklıkta çalışmanın etkisi burada sıvı üreme ortam sıcaklığında araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen değerler şekil 4.60’da verilmiştir. Buna göre en yüksek değerler hücre 25 °C’da üretildiğinde % ee=54.9 ve % C=79.8 olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, önceki deneylerde hücrelerin 30 °C’da üretildiği durumdan daha yüksek olduğundan sonraki deneylerde hücrenin 25 °C sıcaklıkta üretilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.60 Üreme ortamının sıcaklığının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, Süre = 5 gün, $T=30$ °C, KH=120 rpm)

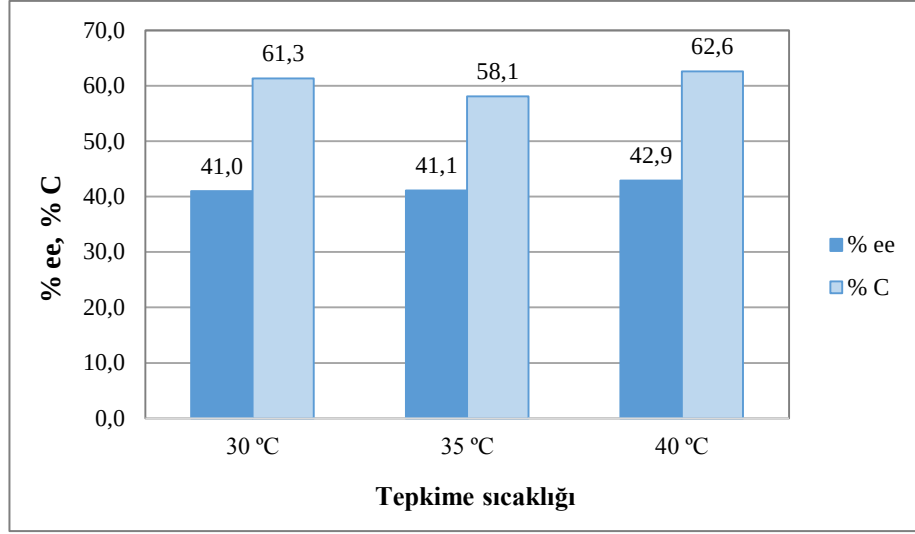
Yapılan kontrol deneylerinde, zorunlu nedenlerle bekleyen hücrelerin aktivitelerinin düştüğü anlaşılmıştır. Bu nedenle mikroorganizmanın kültür koleksiyonundan tekrar temin edilmesi için girişimlerde bulunulmuştur. Bu sırada mikroorganizmanın yedekleri olan, mikroorganizma ilk açıldığında aktarıldığı -20 °C’da bekleyen boncuklardan (Microbank) ve -80 °C’da bekleyen eğik agardaki mikroorganizmadan aktarım yapıp canlandırılmalarına karar verilmiştir. -20 °C’da bekleyen boncuklardan bir kısmı sıvıya

bir kısmı da katıya aktarılmıştır. O ortamda üredikten sonra aktarıldığı katı ortamdan hazırlanan spor çözeltileri kullanılarak üretilen hücreler tepkimede kullanılmış ve elde edilen değerler şekil 4.61’de verilmiştir. Boncuktan aktarımın haricinde bir de -80 °C’da bekleyen eğik agardaki mikroorganizmadan aktarım yapıp canlandırılmış ve tepkimede kullanılarak elde edilen % ee değeri diğer sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Buna göre en yüksek % ee (% 41.6) ve % C değeri (62.7), boncuktan katıya aktarılıp ilk üretimden sonra elde edilen spor çözeltisi kullanılarak üretilen hücrelerle elde edilmiştir. % ee değerleri yükseldiğinden sonraki deneylerde bu spor çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca bu deneyin sonucuna göre; glikozlu üreme ortamında üretildikten sonra boncuklarda saklanan yedekler yaklaşık 2 sene (1 sene 10 ay) -20 °C’da bekledikten sonra önceki sonuçlara benzer değerler vermişlerdir. Fakat boncuktan tek aktarımın mikroorganizmanın canlanması ve aktivite gösterebilmesi için yeterli olduğu anlaşılmıştır. Şekil 4.61’den görüldüğü gibi mikroorganizmanın tam olarak canlanabilmesi için boncuktan canlandırıldıktan sonra ikinci aktarımında % ee değeri 41.6’dan 28’e düşmüştür. Bunun yanında; -80 °C’da MEA ortamında da aynı sürede bekleyen mikroorganizma ile de önceki sonuçlarına benzer değerler elde edilmiştir. Fakat MEA ortamında glikozlu üreme ortamına göre düşük sonuçlar elde edildiğinden sonuçlar boncukta stoklama yöntemine göre düşük kalmıştır. Bilindiği üzere her mikroorganizma için uygun stoklama yöntemi değişkenlik göstermektedir. Bu deney sonucunda *R. oryzae* mikroorganizmasının stoklanma yöntemi olarak boncukta saklanması daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



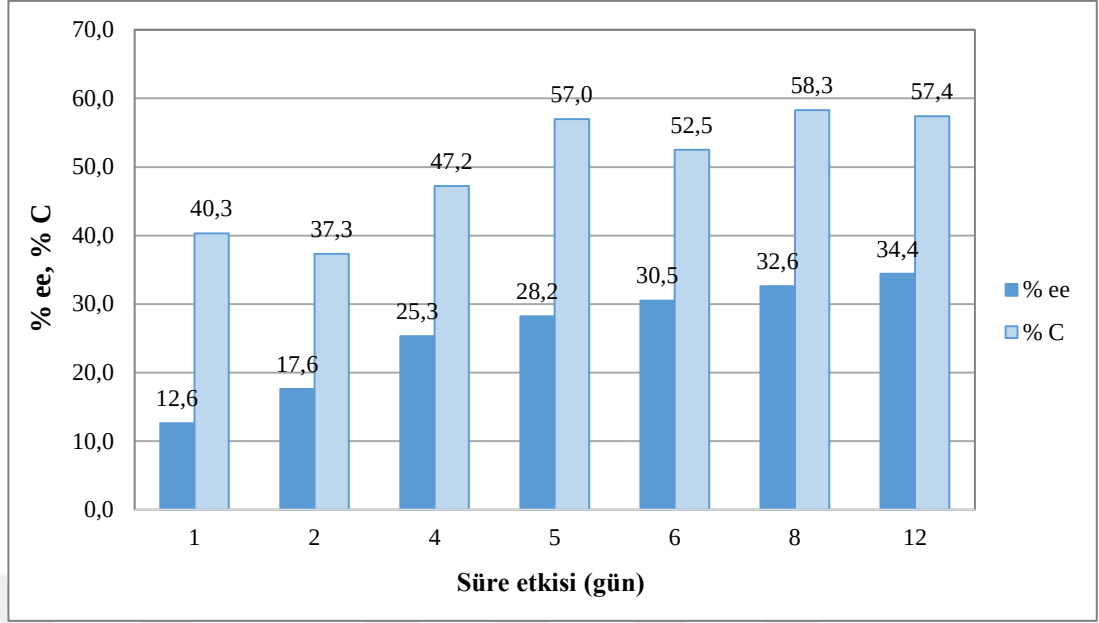
Şekil 4.61 Mikroorganizmanın farklı yedeklerinden çoğaltılmasının etkisi ($C_o=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=120 rpm)

Şekil 4.57’de verilen daha önceki deneylerde tepkime ortam sıcaklığının etkisi 30 °C’da üretilen hücrelerle incelenmişti. Hücrelerin bir de uygun üreme sıcaklığı olarak bulunan 25 °C’da üretildikten sonra tepkime ortam sıcaklığının etkisi araştırılmış ve araştırılan sıcaklık aralığında sonuçların birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.62). İncelenen aralıkta tepkime sıcaklığının değişmesinin sonuçları çok etkilemediği anlaşılmıştır.



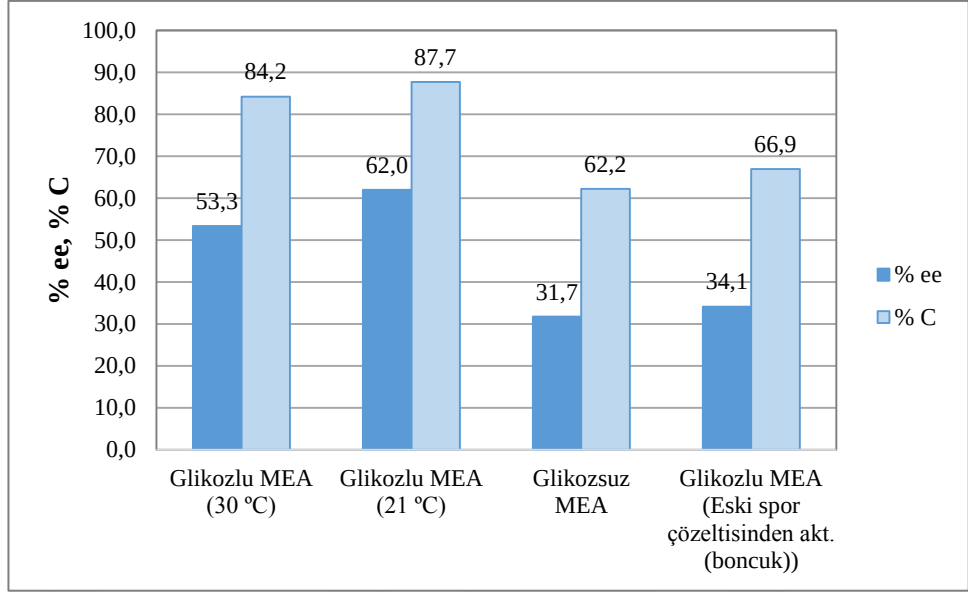
Şekil 4.62 Tepkime sıcaklığının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L (25 °C’da üretilmiş), pH=7, Süre = 5 gün, KH=120 rpm)

Daha önceki çalışmalarda, tepkimeler genellikle 6 günde gerçekleştirilmişti. Fakat süreyle % ee’nin nasıl değiştiğinin gözlenmesi için tepkime süresinin etkisi (1, 2, 4, 5, 6, 8, 12 gün) incelenmiştir. Aynı koşullarda başlatılan tepkimeler farklı sürelerde sonlandırılarak elde edilen veriler şekil 4.63’te verilmiştir. En yüksek % ee değeri 12. günde elde edilmesine rağmen 6. günden sonra % ee değerinde önemli bir artış gözlenmemektedir. Bu nedenle tepkime süresi olarak 6 günün yeterli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.63 Tepkime süresinin etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, $T=30$ °C, KH=120 rpm)

Fakat bu sırada yapılan kontrol deneylerinde, *Rhizopus oryzae* mikroorganizmasının aktivitesindeki azalma nedeniyle kültür koleksiyonundan tekrar temin edilmiş olan mikroorganizmanın açılmasına karar verilmiştir. Mikroorganizma, önceki açılma yönteminde olduğu gibi glikozlu MEA ortamında (Çizelge 3.4'te verilen bileşimdeki ortamda) ve kültür koleksiyonunun önerdiği glikozsuz MEA ortamında (Çizelge 3.5'te verilen bileşimdeki ortamda) açılarak 21 °C'da çoğaltılmıştır. Bir de glikozlu MEA ortamında açılan mikroorganizmanın bir kısmı da önceki açılma yönteminden farklı olarak 30 °C'da üretilerek sonuçların karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bunların dışında bir de önceki deneylerin yapıldığı spor çözeltisinden (boncuktan aktarılan) glikozlu MEA ortamına ekim yapılarak spor çözeltisi tazelenmiştir. Glikozlu ve glikozsuz MEA ortamlarında ve farklı sıcaklıklarda üretilen hücrelerden spor çözeltisi hazırlanarak çizelge 3.6'da bileşimi verilen, önceki sıvı üreme ortamına ekim yapılarak hücreler çoğaltılmıştır. Farklı katı üreme ortamlarında, farklı koşullarda üretilen hücrelerle tepkimeler aynı şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar şekil 4.64'te verilmiştir.



Şekil 4.64 Farklı katı üreme ortamları, farklı sıcaklıklarda üretilen hücrelerin tepkimeye etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L, pH=7, Süre = 6.5 gün, $T=30$ °C, KH=120 rpm)

Buna göre, önceki mikroorganizma açılma yönteminde de gözlendiği gibi glikozlu MEA ortamında üreyen hücreler ile, glikozsuz MEA ortamında üreyen hücrelere göre daha yüksek % ee değeri (yaklaşık 2 kat) elde edilmiştir. Denemek amacıyla glikozlu MEA ortamında 30 °C’da üretilen hücrelerle, aynı ortamda 21 °C’da üretilen hücrelere göre daha düşük % ee değeri elde edilmiştir. Eski spor çözeltisinden (boncuktan aktarılan) aktarım yapılarak tazelenen spor çözeltisinden üretilen hücreler ile, yeni canlandırılan hücrelere göre daha düşük % ee değeri bulunmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek % ee değerinin elde edildiği glikozlu MEA ortamında 21 °C’da üretilen yeni hücrelerle deneylere devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2.4 Deneysel tasarım

Rasemik propranololün *R. oryzae* ile biyokatalitik derasemizasyonuna farklı tepkime parametrelerinin etkilerinin ayrı ayrı incelenmesinin ardından, çeşitli tepkime parametrelerinin etkilerinin eşanlı incelenerek en yüksek % ee değerini sağlayabilecek optimum değerlerin elde edilmesi için deneysel tasarım yöntemleri kullanılmıştır. Bu yolla gerçekte olduğu gibi parametreler arasındaki etkileşimler de dikkate alınabilmekte

ve etkileri hesaplanabilmektedir. Bu amaçla, deneysel tasarım yöntemi olarak Cevap Yüzey Yöntemi kullanılacaktır.

Deney tasarımının en büyük avantajı, deneysel zaman kaybını, malzeme tüketimini ve endüstriyel çapta iş gücünü azaltarak zaman kaybını önemli ölçüde minimize etmesidir (Aytar vd. 2013).

Her seferinde tek bir parametrenin değiştirildiği klasik deneysel yöntemler ile yapılan önceki deneylerin sonuçları incelendiğinde biyotransformasyon tepkime ortamını en çok etkileyen 6 parametrenin (substrat derişimi, hücre derişimi, tepkime ortamının pH'ı, sıcaklık, karıştırma hızı, süre) optimizasyonunun yapılmasına karar verilmiştir. Bir cevap değişkeninin birçok faktörden etkilendiği durumda, bu cevap değişkeninin optimize edilmesi için, problemin modellenmesi ve analiz edilmesinde kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı Cevap Yüzey Yöntemi (Montgomery ve Runger 2007) yaygın olarak uygulanmaktadır. Fakat Cevap Yüzey Yöntemi ile 6 faktör için Box-Behnken Tasarımı yapılması için deney sayısı çok fazla olduğundan (54 deney x 2 tekrar) Bölüm 2.8'de ve çizelge 2.1'de anlatıldığı gibi ilk olarak Plackett Burman Yöntemi kullanılarak en etkili parametrelerin belirlenmesine, daha sonra da belirlenen parametrelerle Cevap Yüzey Yöntemi uygulanmasına karar verilmiştir. Her iki deneysel tasarım yöntemi de Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak uygulanmıştır.

4.2.4.1 Plackett Burman yöntemi

Plackett Burman Deneysel Tasarımı kısmi faktöriyel tasarım yöntemidir. Çok sayıda parametrenin (>5) etkili olduğu proseslerde en etkili parametreleri belirlemek için kullanılır (Eisa vd. 2016). Burada, biyotransformasyon tepkime ortamını en çok etkileyen 6 parametre bulunmaktadır. Yöntem parametrelerin ikili etkileşimlerini ihmal etmektedir (Yerlikaya 2013).

Plackett Burman Yöntemi ile ilgili yoğun bir literatür araştırması yapılmış, edinilen bilgiler ışığında önceki deneylerde elde edilen sonuçlar referans alınarak Plackett

Burman Tasarımı için parametrelerin seviyeleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Cevap faktörü ise tepkime sonunda elde edilen % ee değeridir. Plackett Burman tasarımı parametrelerin seviyelerinin doğru belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Çünkü seviyeler yanlış belirlenirse aslında önemli olan bir parametre tasarım sonucunda önemsiz olarak çıkabilir. Tasarıma dahil edilmeyen ve tepkime ortamı ile hücre üreme ortamını etkileyen diğer parametreler ise önceki deneylerde bulunan uygun koşullarında tutulmuştur.

Çizelge 4.6 Plackett Burman Yöntemi tasarım parametreleri ve seviyeleri

Parametreler	Seviyeler		
	-1	0	+1
Mikroorganizma derişimi (g/L)	50	75	100
Substrat derişimi (mM)	1	3	5
pH	5	6.5	8
Sıcaklık (°C)	30	32.5	35
Karıştırma hızı (rpm)	100	125	150
Süre (gün)	2	4	6

Burada biyotransformasyon tepkime ortamını en çok etkileyen 6 parametre bulunmaktadır. Plackett Burman Tasarımı'nın yapılabilmesi için program 5 adet "dummy" (boş matris) kullanmıştır. Oluşturulan Plackett Burman Tasarım matrisi çizelge 4.7'de verilmiştir. 6 faktör için 3'ü merkez nokta olmak üzere 15 adet deney yapılması gerekmiştir. Diğer tüm deneylerde olduğu gibi bu deneyler de 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların aritmetik ortalaması alınarak programa girilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Plackett Burman Tasarım matrisi

	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Faktör 5	Faktör 6	Faktör 7	Faktör 8	Faktör 9	Faktör 10	Faktör 11	Cevap
Deney No	A:Mikroorganizma derişimi (g/L)	B:Substrat derişimi (mM)	C:pH	D:Sıcaklık (°C)	E:Karıştırma hızı (rpm)	F:Süre (gün)	G	H	J	K	L	% ee
1	100	5	5	35	150	6	-1	-1	-1	1	-1	15.5
2	50	5	8	30	150	6	1	-1	-1	-1	1	11.3
3	75	3	6.5	32.5	125	4	0	0	0	0	0	14.2
4	100	5	8	30	100	2	1	-1	1	1	-1	18.0
5	50	1	5	30	100	2	-1	-1	-1	-1	-1	3.4
6	50	5	5	35	150	2	1	1	1	-1	-1	2.9
7	100	1	8	35	100	6	1	1	-1	-1	-1	22.4
8	50	1	8	30	150	6	-1	1	1	1	-1	25.2
9	100	1	8	35	150	2	-1	-1	1	-1	1	19.1
10	75	3	6.5	32.5	125	4	0	0	0	0	0	15.5
11	100	5	5	30	100	6	-1	1	1	-1	1	12.8
12	50	1	5	35	100	6	1	-1	1	1	1	12.9
13	100	1	5	30	150	2	1	1	-1	1	1	6.2
14	75	3	6.5	32.5	125	4	0	0	0	0	0	16.1
15	50	5	8	35	100	2	-1	1	-1	1	1	7.0

Sonuçlar programa girildikten sonra cevap değeri olan % ee için analizlenmiş, program tarafından hesaplanan istatistiksel veriler değerlendirilmiş ve önemli parametrelerin belirlendiği Pareto Grafiği elde edilmiştir.

Plackett Burman deneysel tasarım yöntemi sonucunda elde edilen varyans analizi (ANOVA) sonuçları çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Plackett Burman Tasarımı sonucunda elde edilen varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Değişimin kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri Prob>F	Yorum
Model	574.78	7	82.11	40.80	0.0001	önemli
A: Mikroorganizma derişimi	81.64	1	81.64	40.56	0.0007	
B: Substrat derişimi	39.24	1	39.24	19.50	0.0045	
C: pH	202.54	1	202.54	100.63	<0.0001	
F: Süre	157.69	1	157.69	78.34	0.0001	
J	52.50	1	52.50	26.08	0.0022	
K	13.87	1	13.87	6.89	0.0393	
L	27.30	1	27.30	13.56	0.0103	
Uyum eksikliği	10.19	4	2.55	2.70	0.2880	önemsiz
Hata	1.89	2	0.94			

ANOVA sonuçlarına göre model önemli, uyum eksikliği (lack of fit) ise önemsizdir. Modelin F değerinin yüksek olması ve modelin p (olasılık) değerinin (0.0001) 0.05’ten küçük olması modelin % 95 güven seviyesinde, istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermektedir (Murthy vd. 2000). Bunun yanında modeli değerlendirmek için başka bir yöntem de ANOVA sonuçlarına göre uyum eksikliğin (lack of fit) önemsiz çıkmasıdır. Bu durum, modelin uyumunun tatmin edici olduğunu göstermektedir (Bezerra vd. 2008).

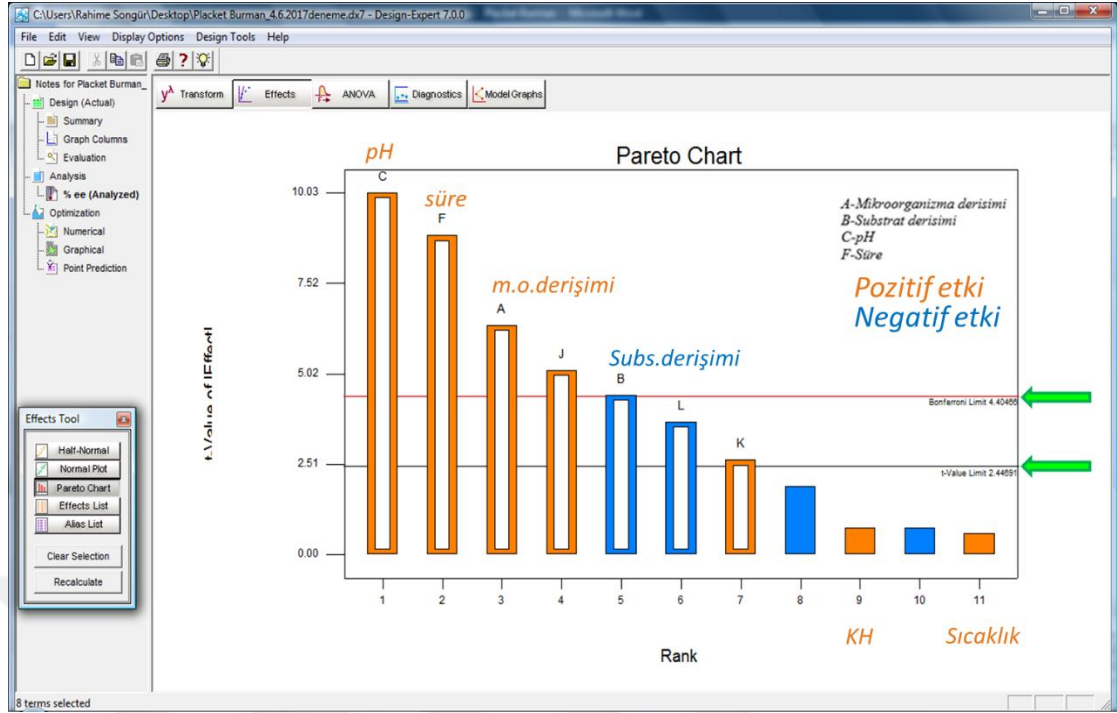
ANOVA sonuçlarına göre elde edilen standart sapma, R^2 ve yeterli kesinlik (adequate precision) değerleri çizelge 4.9’da verilmiştir. R^2 değeri 0.9794 olarak, Adj R^2 ve Pred R^2 ise birbirlerine yakın olarak bulunmuştur. 4’ten büyük olması gereken yeterli kesinlik (adequate precision) değeri de 19.837 olarak bulunmuştur. ANOVA sonuçlarından

incelenen 6 parametre içinden önem sırasına göre; pH, süre, mikroorganizma derişimi ve substrat derişiminin tepkimeyi etkileyen önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Elde edilen Pareto grafiğı ise şekil 4.65’te verilmiştir. Pareto Grafiğinden de görüldüğü gibi substrat derişimi en önemli parametrelerin belirlendiğı “Bonferroni Limiti”nin tam sınırındadır. Pareto Grafiğinde “Bonferroni Limiti”nin üzerinde kalan faktörler prosesteki en etkili faktörler olarak belirlendiğinden (Dholariya vd. 2014) Cevap Yüzey Yönteminin uygulanması için bu limitin üzerindeki üç parametre (pH, süre, mikroorganizma derişimi) alınmış ve bu 3 parametre için Cevap Yüzey Yöntemi uygulanmıştır.

Çizelge 4.9 ANOVA sonuçlarına göre elde edilen standart sapma, R^2 ve yeterli kesinlik değerleri

Özellik	Değer
Standart sapma	1.42
R^2 Değeri	0.9794
Düzeltilmiş R^2 değeri (Adjusted R^2)	0.9554
Tahmini R^2 değeri (Predicted R^2)	0.8397
Yeterli kesinlik (Adequate precision)	19.837

Pareto grafiğı aynı zamanda parametrelerin cevap değişkenine gösterdiği pozitif ya da negatif etkileri göstermektedir. Bu da; Cevap Yüzey Yöntemi için belirlenen en etkili parametrelerin seviyelerinin belirlenmesinde ve Cevap Yüzey Yöntemi haricinde tutulan parametrelerin tasarımda hangi değerde sabit tutulması gerektiğı konusunda önem taşımaktadır. Şekil 4.65’ten görüldüğü gibi Plackett Burman yönteminde incelenen 6 parametreden pH, süre, mikroorganizma derişimi, karıştırma hızı ve sıcaklığın artması cevap değeri olan % ee değerine pozitif etki (turuncu) gösterirken, substrat derişiminin artması negatif etki (mavi) göstermiştir. Buna dayanarak en önemli 3 parametrenin haricindeki parametrelerden % ee değerine pozitif etki gösterenler (karıştırma hızı ve sıcaklık) Plackett Burman tasarımındaki üst seviyelerinde (KH=150 rpm, T=35 °C) tutulurken, negatif etki gösteren substrat derişimi tasarımıdaki alt seviyesinde ($C_0=1$ mM) tutulmuştur.



Şekil 4.65 Elde edilen Pareto Grafiği (A:mikroorganizma derişimi, B:substrat derişimi, C:pH, D:sıcaklık, E:karıştırma hızı, F:süre, G,H,J,K,L: dummy (boş matris))

4.2.4.2 Cevap yüzey yöntemi

Plackett Burman yöntemi ile belirlenen, biyotransformasyon tepkime ortamındaki % ee değerini etkileyen en etkili üç parametre (pH, süre, mikroorganizma derişimi) için Cevap Yüzey Yöntemi (modifiye edilmiş Box-Behnken Tasarımı) uygulanmıştır. Plackett Burman tasarımı parametrelerin pozitif ya da negatif etki gösterme durumu aynı zamanda Cevap Yüzey Yöntemi için parametrelerin seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Şekil 4.65'te görülen Pareto grafiğine göre; Plackett Burman tasarımı sonucunda, tepkime ortamındaki en etkili parametreler olarak belirlenen pH, süre ve mikroorganizma derişiminin hepsi de cevap değişkeni olan % ee değerine pozitif etki göstermektedir. Bu nedenle bu üç parametrenin Plackett Burman tasarımındaki üst seviyeleri (pH=8, süre= 6 gün, m.o. derişimi=100 g/L) bu tasarımda merkez nokta olarak kullanılmıştır. pH 8 merkez nokta olduğunda pH aralıkları 7; 8; 9 olarak belirlenmiştir. Bu şekilde deneylere başlanmış fakat substrat (propranolol), pH 9 fosfat tamponunda çözündüğünde çözelti renk değiştirip substrat bozunmuştur (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0884?lang=en®ion=TR>,

2018). Bu nedenle fazla bazik bölgede çalışma kısıtlaması olduğundan pH için merkez nokta pH 7 olarak belirlenmiştir. Son duruma göre, Cevap Yüzey Yöntemi için belirlenen parametre seviyeleri çizelge 4.10'da verilmiştir. Bu deneylerde Plackett Burman Yöntemi'nden edinilen bilgiye dayanarak substrat derişimi 1 mM, sıcaklık 35 °C ve karıştırma hızı 150 rpm olarak uygulanmıştır.

Çizelge 4.10 Cevap Yüzey Yöntemi Box-Behnken tasarımı parametre ve seviyeleri

Faktör	Parametre	Seviyeler		
		-1	0	+1
A	pH	6.4	7	7.6
B	Süre (gün)	4	6	8
C	Mikroorganizma derişimi (g/L)	70	100	130

Box-Behnken Tasarımı, matematiksel modelin birinci ve ikinci dereceden katsayılarının etkili tahminini sağlayan, deneysel noktaların merkez noktasından eşit uzaklıkta bir küre şeklinde olduğu, birçok kimyasal ve fiziksel prosesin optimizasyonunda uygulanan bir yöntemdir (Bezerra vd. 2008). Üç parametre için oluşturulan Cevap Yüzey Yöntemi Box-Behnken Tasarımı'na göre 5'i merkez nokta olmak üzere 17 adet deney gereklidir. Burada, yapılan ön çalışmalardan faydalanılarak deneysel tasarımın +1, -1 aralığında değerlendirilmesinin daha anlamlı olduğu anlaşılmış, fakat sadece bazı deneylerde $+\alpha$ ve $-\alpha$ değerleri kullanılarak modifiye edilmiş Box-Behnken Tasarımı yapılmıştır. Cevap faktörü, Plackett Burman Tasarımı'nda olduğu gibi tepkime sonunda elde edilen % ee değeridir. Bu deney tasarımının tasarım matrisi ve elde edilen deneysel sonuçlar çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11 Cevap Yüzey Yöntemi Box-Behnken tasarım matrisi ve elde edilen cevap değerleri

Deney No	Parametreler			Cevap değişkeni
	A pH	B Süre (gün)	C Mikroorganizma derişimi (g/L)	% ee
1	7.60	4.00	70.00	36.0
2	6.40	8.00	70.00	34.2
3	7.00	9.36	100.00	43.4
4	7.00	6.00	49.55	22.5
5	7.60	4.00	130.00	33.3
6	7.60	8.00	130.00	24.6
7	7.00	6.00	100.00	54.4
8	7.00	6.00	100.00	53.9
9	6.40	4.00	130.00	40.8
10	7.00	6.00	100.00	54.1
11	7.00	6.00	100.00	54.5
12	7.60	8.00	70.00	24.1
13	7.00	6.00	100.00	53.7
14	6.40	8.00	130.00	44.0
15	8.01	6.00	100.00	23.6
16	7.00	6.00	100.00	53.3
17	6.40	4.00	70.00	35.8

Bu tasarıma göre yapılan deney sonuçları programa girildikten sonra cevap değeri olan % ee için analizlenmiş, uygun olan cevap modeli belirlenmiş, program tarafından hesaplanan istatistiksel veriler değerlendirilmiş ve cevap yüzey grafikleri elde edilmiştir.

Program tarafından yapılan analiz sonucunda tasarım modeli kuadratik model (ikinci dereceden polinom modeli) olarak önerilmiştir. Model aşağıdaki eşitlikte verilmiştir:

$$\% ee = 53.97 - 4.67 A - 2.45 B + 1.65 C - 2.78 AB - 2.12 AC + 1.00 BC - 7.82 A^2 - 2.16 B^2 - 10.02 C^2$$

Burada; % ee cevap değişkeni olmak üzere; A, B, C değişkenleri sırasıyla pH, süre, mikroorganizma derişiminin kodlanmış değerlerini ifade etmektedir ve B gün, C ise g/L birimindedir.

Elde edilen modelin varyans analizi (ANOVA) sonuçları çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12 Cevap Yüzey Yöntemi sonucunda elde edilen varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Değişimin kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri Prob>F	Yorum
Model	2375.53	9	263.95	936.74	<0.0001	önemli
A: pH	187.93	1	187.93	666.94	<0.0001	
B: Süre	51.63	1	51.63	183.24	<0.0001	
C: Mikroorganizma derişimi	23.41	1	23.41	83.09	<0.0001	
AB	61.61	1	61.61	218.63	<0.0001	
AC	36.13	1	36.13	128.21	<0.0001	
BC	8.00	1	8.00	28.39	0.0011	
A ²	428.49	1	428.49	1520.68	<0.0001	
B ²	32.60	1	32.60	115.71	<0.0001	
C ²	702.76	1	702.76	2494.07	<0.0001	
Uyum eksikliği	0.96	2	0.48	2.39	0.1869	önemsiz
Hata	1.01	5	0.20			

ANOVA sonuçları incelendiğinde; Fisher varyans oranı olarak bilinen F değeri, bu model için 936.74 olarak ve bu değerin deneysel gürültüden kaynaklanma olasılığı % 0.01 olarak belirlenmiştir. Modelin F değerinin yüksek olması ve modelin p (olasılık) değerinin (<0.0001) 0.05’ten küçük olması modelin % 95 güven seviyesinde, istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu ve matematiksel modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir (Murthy vd. 2000, Bezerra vd. 2008). Bunun yanında ANOVA sonuçlarına göre uyum eksikliğinin (lack of fit) önemsiz çıkması da önem taşımaktadır. Bu durum, model eşitliğinin % ee değerini yeterli derecede tahmin ettiğini yani modelin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermektedir (Gajdhane vd. 2016).

RSM sonucunda elde edilen standart sapma, R² ve yeterli kesinlik (adequate precision)

değerleri çizelge 4.13'te verilmiştir. Standart sapma değerinin küçük olması, verilerin ortalamaya yakın olduğunu göstermiştir. Modelin R^2 değeri 0.9992 olarak bulunmuştur. R^2 değeri gözlenen ve tahmin edilen cevap değerleri arasındaki ilişkiyi, yani polinomik modelin verilerle ne kadar uyumlu olduğunu gösterir. R^2 değerinin 0.75'ten büyük olması modelin uygunluğunu gösterir. İyi bir istatistiksel modelin R^2 değeri 1'e yakın olmalıdır. Ayrıca düzeltilmiş R^2 (adjusted R^2) ve tahmini R^2 (predicted R^2) değerlerinin birbirlerine yakın değerler olması istenir (Yang vd. 2017, Niladevi vd. 2009). Aralarında en fazla % 20 fark olmalıdır (Rai vd. 2016). Bu çalışmada da düzeltilmiş R^2 değeri 0.9981 ve tahmini R^2 değeri 0.9873 olarak bulunmuştur. R^2 değerlerinin mikrobiyal bir çalışmada bu şekilde yüksek bulunması önem taşımaktadır.

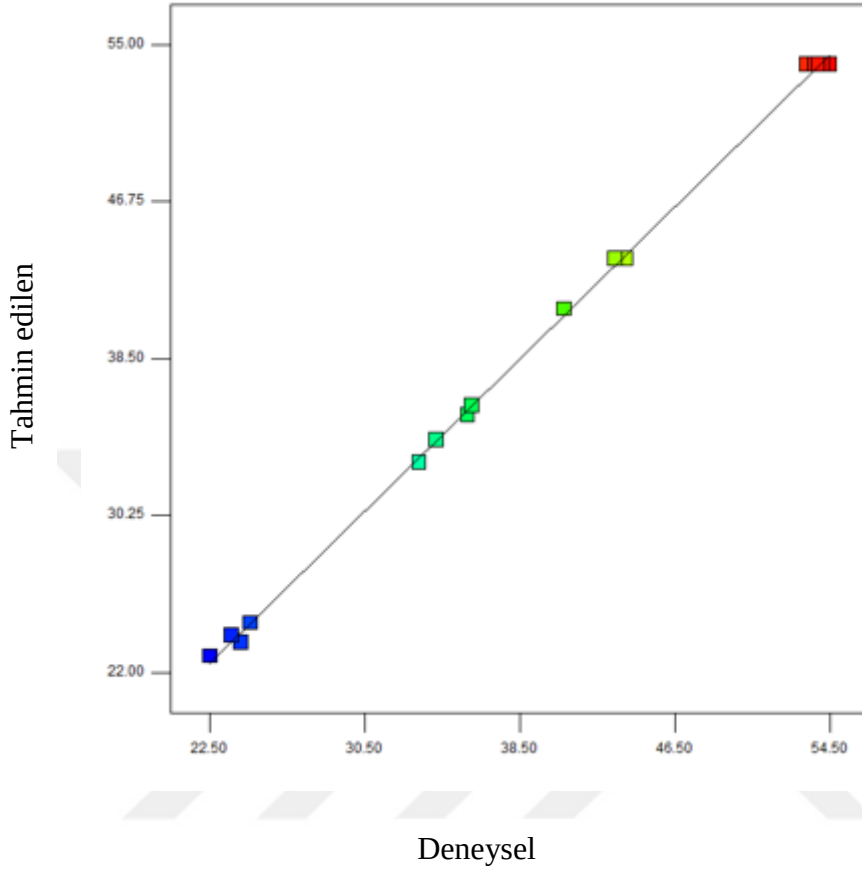
Çizelge 4.13 Cevap Yüzey Yöntemi sonucunda elde edilen standart sapma, R^2 ve yeterli kesinlik ve varyasyon katsayısı değerleri

Özellik	Değer
Standart sapma	0.53
R^2 Değeri	0.9992
Düzeltilmiş R^2 değeri (Adjusted R^2)	0.9981
Tahmini R^2 değeri (Predicted R^2)	0.9873
Yeterli kesinlik (Adequate precision)	76.430
Varyasyon katsayısı (% CV)	1.32

Çizelge 4.13'te görüldüğü gibi sinyal/gürültü oranının göstergesi olan “yeterli kesinlik (adequate precision)” değeri 76.430 olarak bulunmuştur. Bu, modelin tasarım alanını yönlendirebildiğini göstermektedir. Yeterli kesinlik değerinin 4'ten büyük olması, modelin verilere iyi uyduğunu düşündürmesi için önkoşuldur (Patil vd. 2016). Varyasyon katsayısı değerinin düşük olması (% CV=1.32) modelin kesinlik derecesini ve güvenilirliğini gösterir (Murthy vd. 2000, Gajdhane vd. 2016). ANOVA sonuçlarına göre; modeldeki tüm terimlerin p değerinin <0.05 olduğu ve böylece A (pH), B (süre), C (mikroorganizma derişimi), A^2 (pH^2), B^2 ($süre^2$), C^2 (mikroorganizma derişimi²) ve AB, AC, BC ikili etkileşimlerinin modeldeki önemli terimler olduğu belirlenmiştir (Sun vd. 2007).

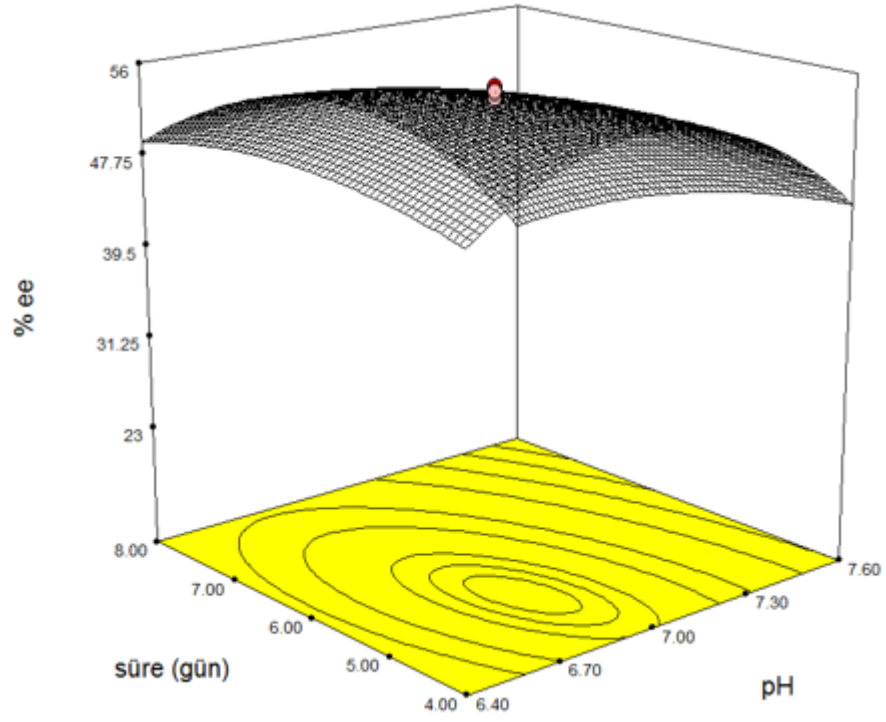
Deneyisel veriler ile modelden tahmin edilen değerlerin ilişkisi şekil 4.66'da grafiksel

olarak verilmiştir.

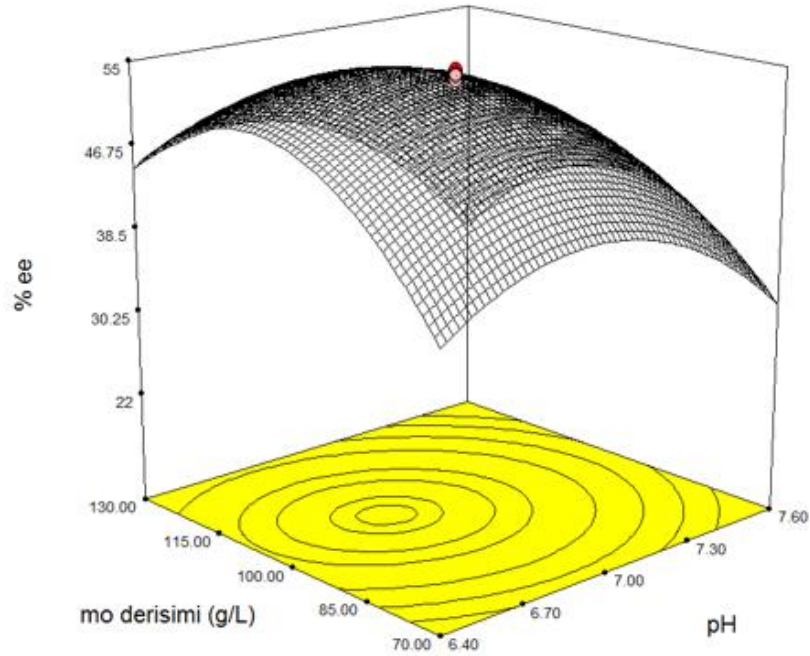


Şekil 4.66 Elde edilen deneysel veriler ile modelden tahmin edilen değerlerin değişimi

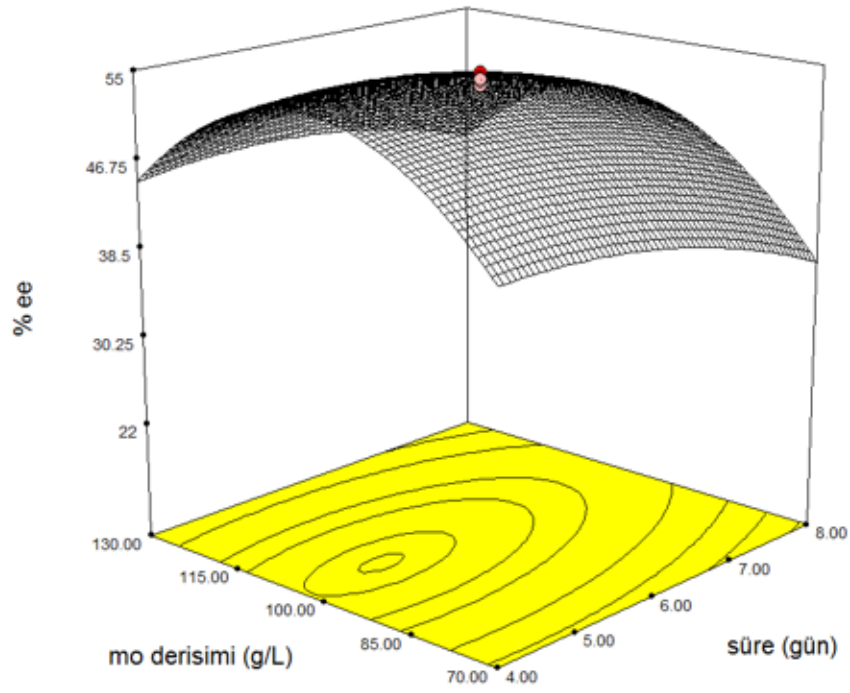
Tahmin edilen model eşitliğinin görselleştirilmesi cevap yüzeyi grafikleriyle yapılabilir (Bezerra vd. 2008). Model denklemi kullanılarak oluşturulan ve % ee cevap değerine bağımsız değişkenler olan parametrelerin ikili etkilerini gösteren üç boyutlu cevap yüzey grafikleri ve izohips eğrileri şekil 4.67-4.72 arasında verilmiştir. Özellikle izohips eğrilerini içeren grafiklerde net bir şekilde görüldüğü gibi tüm grafiklerde % ee'nin maksimum olduğu bölge gözükmemektedir. Bu da; Cevap Yüzey Yöntemi parametre seviyelerinin doğru seçildiğini göstermektedir.



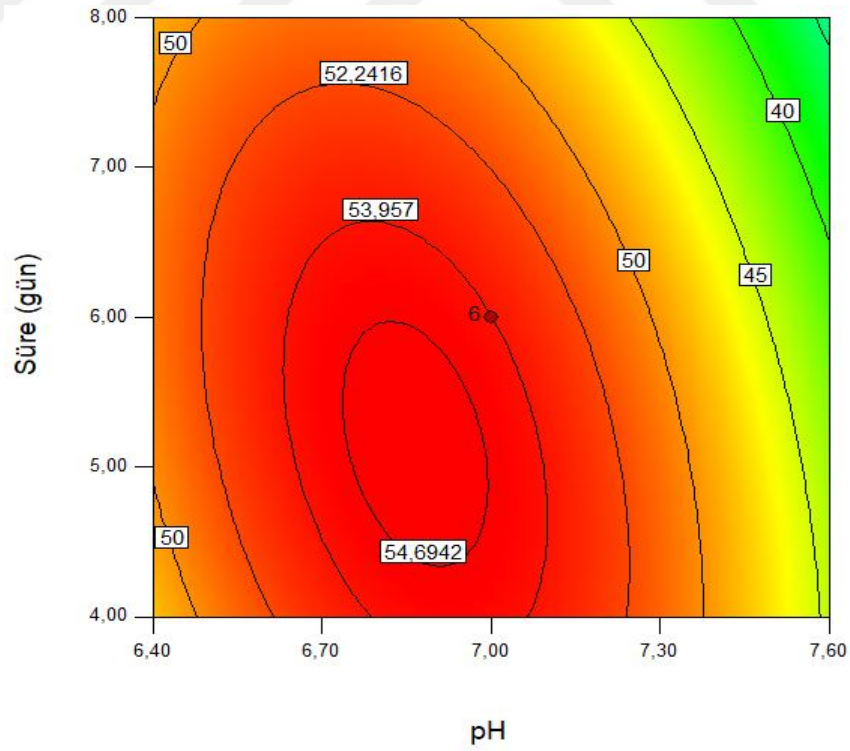
Şekil 4.67 pH ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin üç boyutlu cevap yüzey grafiği (mikroorganizma derişimi=100 g/L)



Şekil 4.68 pH ile mikroorganizma derişiminin % ee değerine ikili etkisinin üç boyutlu cevap yüzey grafiği (süre=6 gün)

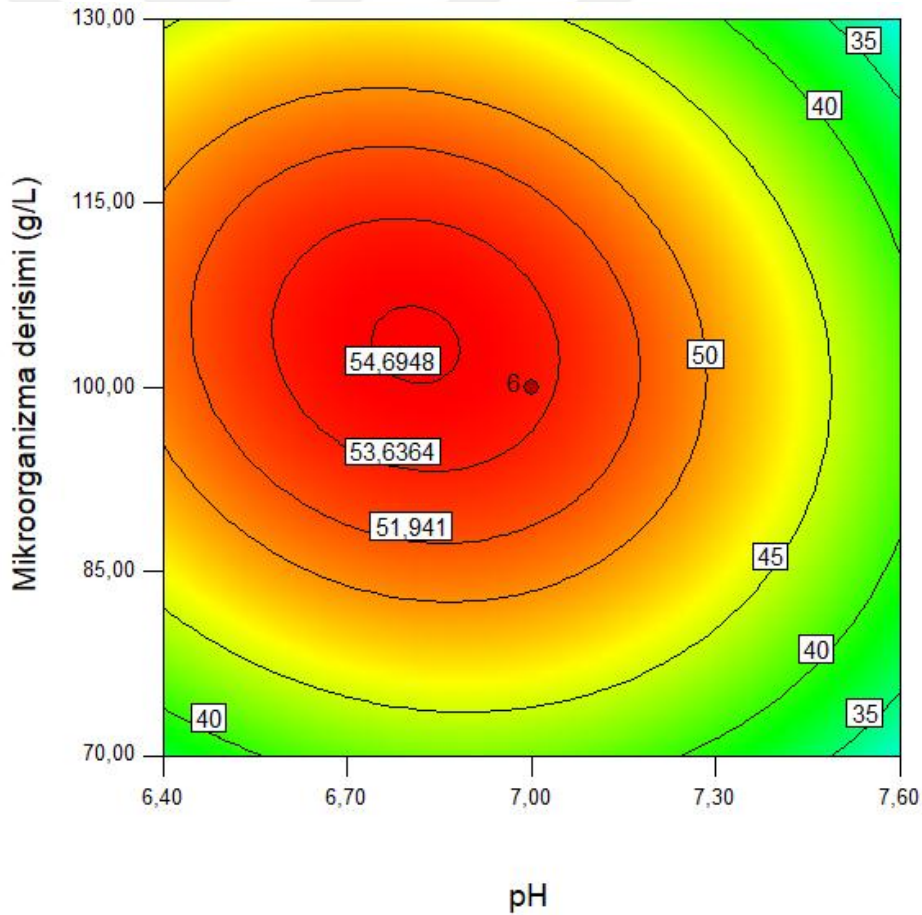


Şekil 4.69 Mikroorganizma derişimi ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin üç boyutlu cevap yüzey grafiğı (pH=7)



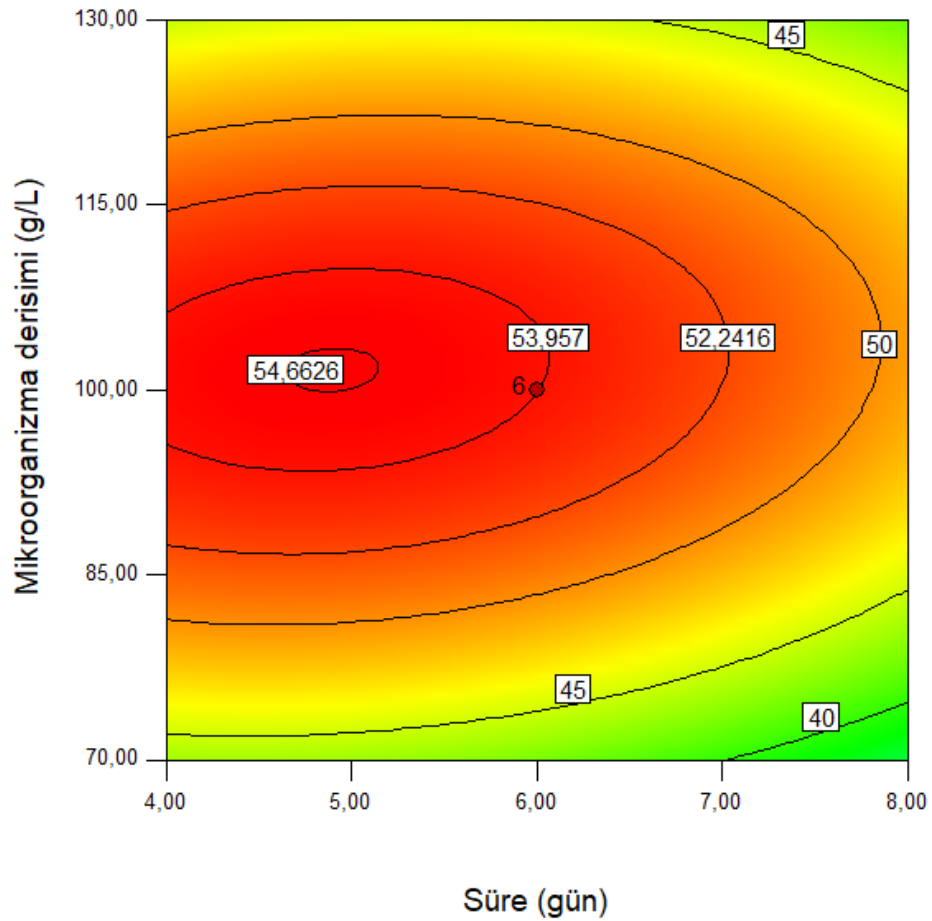
Şekil 4.70 pH ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin izohips eğrileri ile gösterimi (mikroorganizma derişimi=100 g/L)

Şekil 4.70’de pH ve sürenin % ee’ye ikili etkisi görülmektedir. 100 g/L sabit mikroorganizma derişiminde elde edilen bu grafikte pH’ın bazik değerlerine kadar pH sabit iken süre arttıkça % ee önce artmakta, sonra azalmaktadır. Süre sabit iken ise pH değeri arttıkça nötral pH değerlerine kadar % ee önce artmakta, sonra azalmaktadır. Bu sonuç, *R. oryzae* mikroorganizmasının içerisindeki NADH oksidaz enziminin Hummel ve Riebel’in (2003) çalışmasında enzim aktivitesinin pH 6-7’de en yüksek seviyelerdeyken bazik pH’larda düşmesi ile açıklanabilir. Aynı zamanda *R. oryzae* mikroorganizmasının içerisindeki ADH enzimiyle ilgili olarak Zanon vd. (2007) çalışmasında ADH enziminin farklı pH’lardaki kararlılığı incelendiğinde benzer şekilde pH 6-7 aralığında enzim kararlı davranırken asidik (pH 4-5) ve bazik pH’larda (pH 8-10) kararlılığı düşmektedir. Gerçekleştirilen tepkime 4-8 gün aralığında gerçekleştirildiğinden enzim kararlılığının da etkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.71 pH ile mikroorganizma derişiminin % ee değerine ikili etkisinin izohips eğrileri ile gösterimi (süre=6 gün)

Şekil 4.71’de pH ve mikroorganizma derişiminin % ee’ye ikili etkisi görölmektedir. Tepkime süresinin 6 gün olduğu grafikte sabit bir mikroorganizma derişiminde pH arttıkça pH 6.8-6.9 değerlerine kadar % ee değeri artmakta, daha sonra azalmaktadır. Aynı zamanda sabit mikroorganizma derişiminde pH etkisinin bazik pH’larda daha baskın olduğu gözlenmiştir. Sabit bir pH değerinde ise mikroorganizma derişimi arttıkça % ee önce artmakta, sonra azalmaktadır. Mikroorganizma derişimi az olduğunda tepkime için gereken enzim miktarı yetersiz kaldığı için % ee değerinin düşük olduğu düşünölmektedir. Mikroorganizma derişimi arttıkça % ee’de azalma görölme sebebinin ise mikroorganizma derişimi yüksek olduğunda 6 günlük tepkime süresince ortamdaki mikroorganizmaların öbikleşmesi ve bu durumun iç kütle aktarım kısıtlamalarına yol açması olduğu düşünölmektedir.



Şekil 4.72 Mikroorganizma derişimi ile sürenin % ee değerine ikili etkisinin izohips eğrileri ile gösterimi (pH=7)

Şekil 4.72’de süre ve mikroorganizma derişiminin % ee’ye ikili etkisi görölmektedir. Grafikteki cevap yüzey değerlerinin eliptik olması bu ikili etkileşimin cevap değeri olan % ee’ye önemli bir etkisinin olduğunu göstermektedir. ANOVA sonuçları da bunu doğrulamaktadır (p değeri 0.0001<0.05). Mikroorganizma derişimi 72 g/L’den 100 g/L’ye, tepkime süresi de 4 günden 5 güne yükseldiğinde % ee değerinin % 45’ten 54.6’ya yükseldiği gözlenmiştir. Şekil 4.72’ye göre en yüksek % ee değeri pH 7’de 100 g/L mikroorganizma derişiminde yaklaşık 5 gün tepkime süresinde % 54.6 olarak elde edilmiştir.

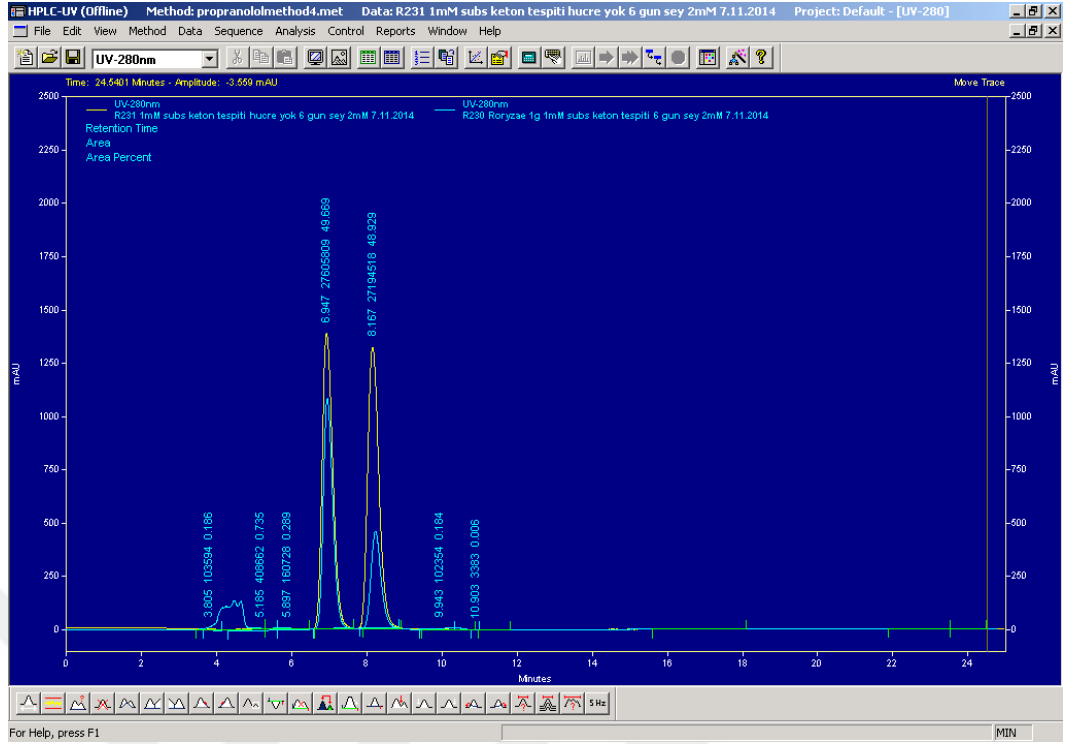
Cevap Yüzey Yöntemine göre % ee değerini maksimize eden parametre değerleri: A (pH)=6.86, B (süre)=5.36 gün, C (mo derişimi)=101 g/L olarak belirlenmiştir. Bu koşulda öngörölen cevap: % ee= 54.72 iken aynı koşulda yapılan deney sonucunda % ee =52.30 bulunmuştur. Birbirine yakın sonuçlar elde edilmesi, RSM sonucu ile elde edilen denklemin tepkime için uygun olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte optimum tepkime parametrelerinin merkez noktaya çok yakın olduğu görölmektedir. Bu durum da tasarımın aralıklarının iyi seçildiğini göstermektedir.

4.2.5 Tepkime mekanizmasının belirlenmesi

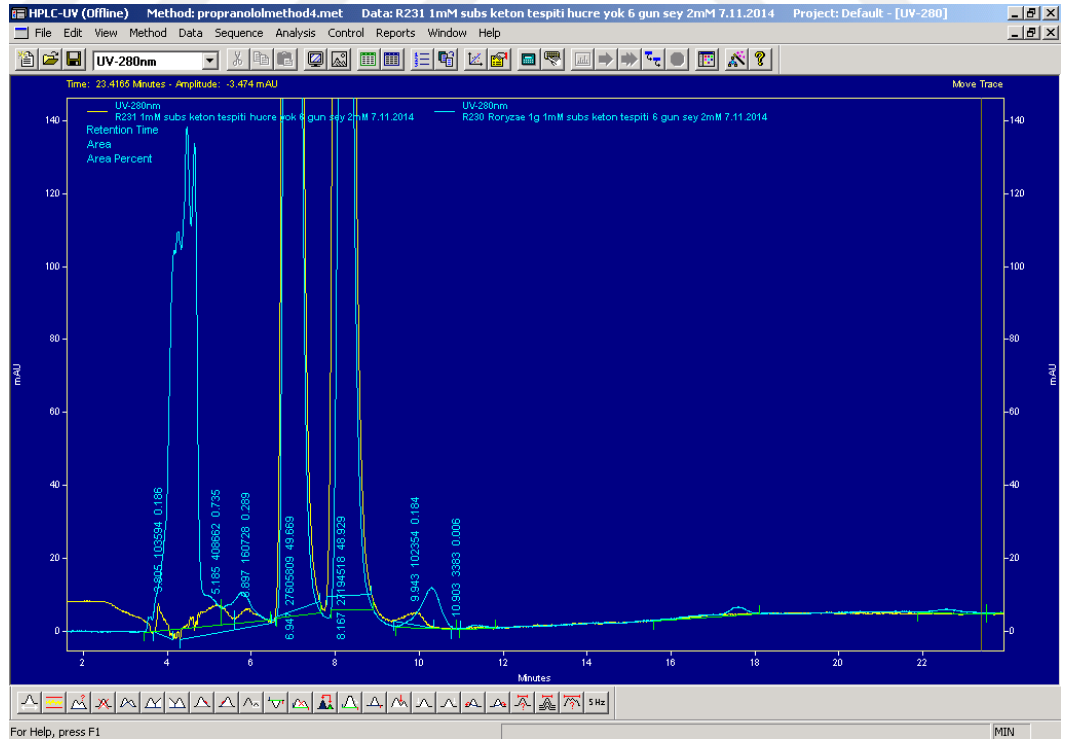
Rasemik propranolölün biyokatalitik derasemizasyonu tepkimesi farklı koşullarda gerçekleştirilmiş ve *R. oryzae* mikroorganizmasının propranolölü enantiyoseçimli olarak dönüştürdüğü gözlenmiştir. Fakat, propranolölün derasemizasyonunun gerçekleştiği mekanizma ile ilgili literatürde de herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Şekil 4.18’de önerilen mekanizma, sekonder alkollerin derasemizasyonu çalışmalarından yola çıkılarak bir sekonder amino alkol olan propranolölün derasemizasyonunun gerçekleştiği düşünölen mekanizmadır. *R. oryzae* mikroorganizmasının redoks potansiyeline sahip olması da (Comasseto vd. 2004) derasemizasyonun bu mekanizma üzerinden yürümesini desteklemektedir. Doktora çalışmasında, bu mekanizmayı doğrulamaya ve aydınlatmaya yönelik bazı incelemeler de yapılmıştır. Bunlar; tepkimedeki bileşenlerin miktarlarının zamanla değişiminin incelenmesi, tepkime ortamına ADH aktivatörü olarak kullanıldığı bilinen

merkaptotanolün eklenmesinin, kosubstrat olarak glikoz ve tepkime ortamındaki oksijenin etkisinin incelenmesi, saf R ve saf S propranolol ile tepkimenin gerçekleştirilerek HPLC, FTIR ve HRMS analizlerinin karşılaştırılarak mekanizma hakkında yorum yapılması olmuştur.

Şekil 4.18’de verilen mekanizma ile ilişkili olarak tepkime ortamında ara ürün olarak oluştuğu düşünülen keton için ek pik oluşup oluşmadığını HPLC analizinde gözleyebilmek için bir deney yapılmıştır. Rasemik propranolol ile tepkime gerçekleştirilirken iki katı hacimde tepkime ortamı hazırlanıp ikiye bölünmüş, birine hücre eklenip diğerine eklenmeden aynı deneysel işlemler uygulanıp HPLC analizleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.73). Farkı gözlemleyebilmek için bu karşılaştırmanın yakınlaştırılmış hali şekil 4.74’te verilmiştir. Buna göre, hücre olan durumda yani tepkime gerçekleştirildiğinde yaklaşık 4, 6, 10, 18 ve 22. dakikalarda küçük ek pikler gözlenmiştir. Fakat ketonun safı ticari olarak piyasada bulunmadığından gözlenen ek piklerin ketona ait olup olmadığı HPLC analizi ile tespit edilememiş, ek analize ihtiyaç duyulduğu anlaşılmıştır.



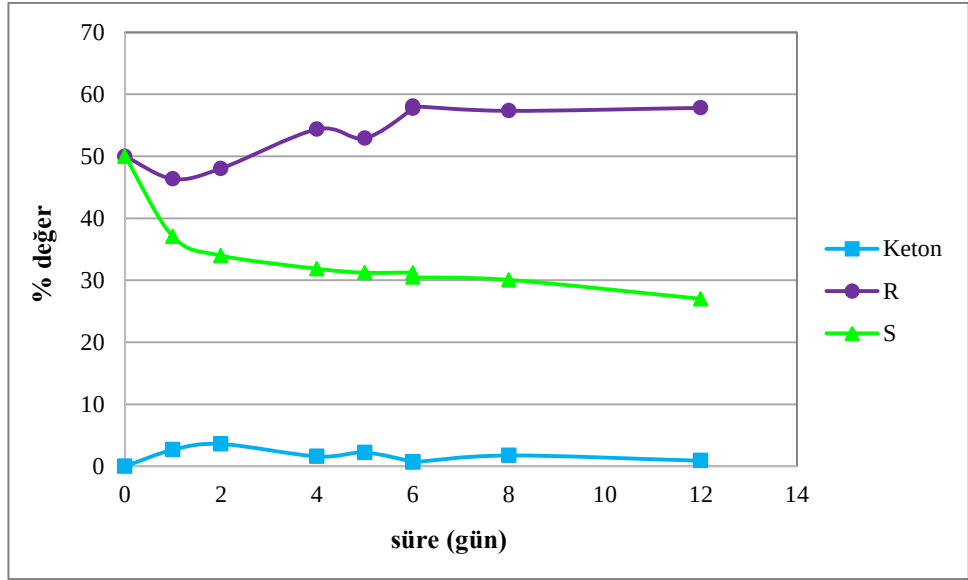
Şekil 4.73 Keton tespiti için HPLC analiz sonuçları karşılaştırılması (mavi çizgi:hücre var, sarı çizgi: hücre yok) (mavi: $C_0=1$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae=100$ g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=150 rpm)



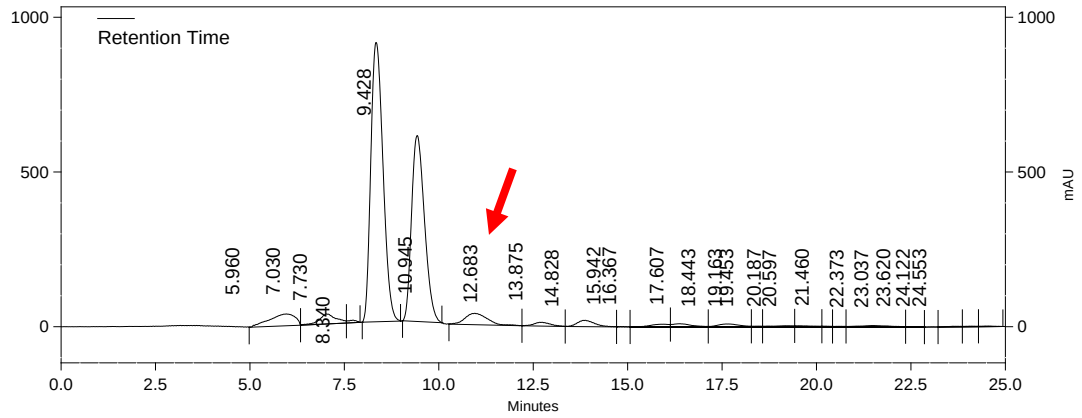
Şekil 4.74 Keton tespiti için HPLC analiz sonuçları karşılaştırmasının yakınlaştırılmış hali (mavi çizgi:hücre var, sarı çizgi: hücre yok)

Cardus vd. (2004) çalışmalarında bir amidoalkol olan rasemik N-(1-hidroksi-1-feniletıl) benzamid'in *Cunninghamella echinulata* NRRL1384 mikroorganizması (tüm hücre) ile mikrobiyal derasemizasyonu ile R-enantiyomerinin üretimini gerçekleştirmişlerdir. Derasemizasyon, amidoalkolün hızlı S-seçimli yükseltgenmesi ve ardından ketonun kısmi S-seçimli indirgenmesi daha yavaş olarak gerçekleşerek % 57 verim (R-amidoalkol), % 92 ee elde edilmiştir. Tepkime karışımında bulunan keton miktarı ise % 4'tür. Bu da derasemizasyonun hücre içindeki redoks enzimleri ile katalizlendiğini gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

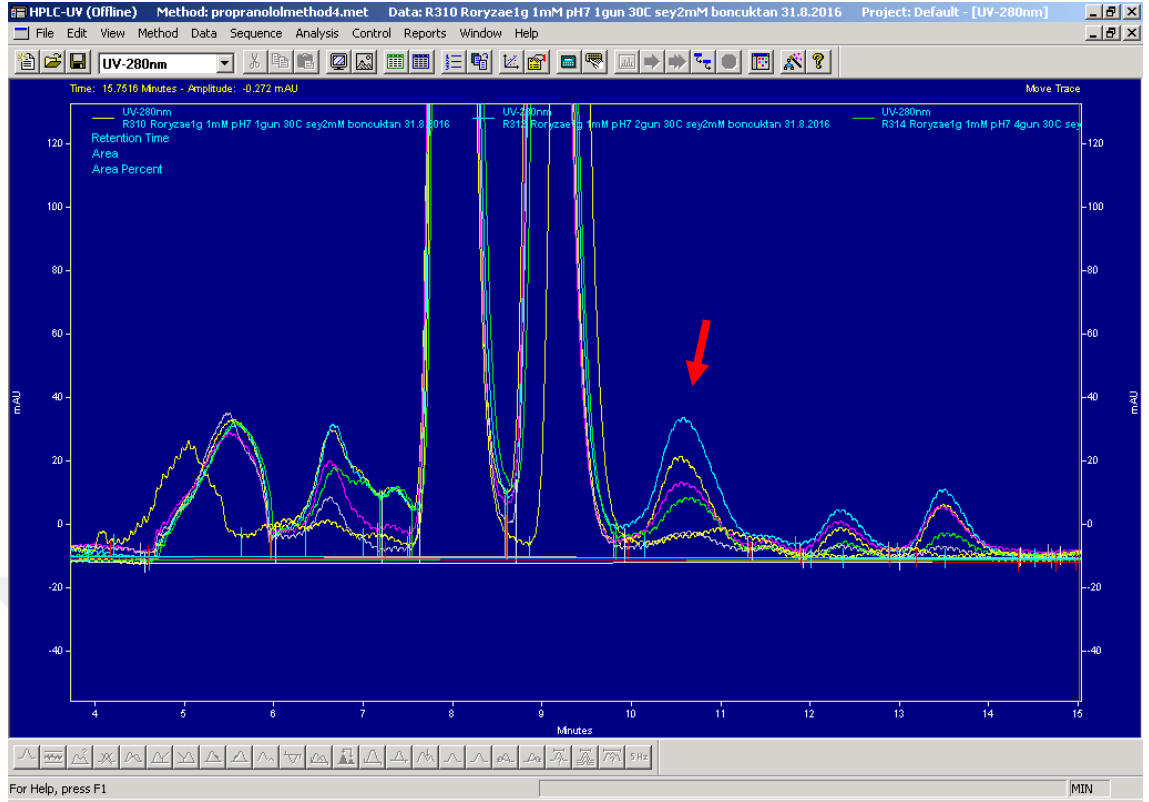
Bu çalışmada ise süre etkisinin araştırıldığı deneylerin HPLC analiz sonuçları incelendiğinde propranolol piklerinden sonra yaklaşık 11. dakikada gelen küçük bir pikin ilk iki gün % 2.7-3.6 oranlarında olduğu ve tepkime süresinin artmasıyla azaldığı gözlenmiştir. Bu pikin keton piki olduğu varsayılarak gerçekleştirilen derasemizasyonda bileşenlerin miktarlarının zamanla değişimi çizilmiş ve şekil 4.75'te verilmiştir. Bu grafik Cardus vd. (2004) çalışmasında verilen amidoalkolün derasemizasyonunda enantiyomerler ile ketonun tepkime ortamındaki yüzdelерinin zamanla değişimi grafiğine benzer eğilim göstermektedir. Şekil 4.76'da rasemik propranololün *R. oryzae* ile derasemizasyonunda 2. güne ait HPLC analiz sonucu verilmiş, ketona ait olduğu varsayılan pik işaretlenmiştir. Şekil 4.77'de ise rasemik propranololün *R. oryzae* ile derasemizasyonunda farklı tepkime sürelerindeki HPLC analiz sonuçlarının karşılaştırılması görülmektedir.



Şekil 4.75 Rasemik propranololün *R. oryzae* ile derasemizasyonunda tepkimedeki bileşenlerin miktarlarının zamanla değişimi

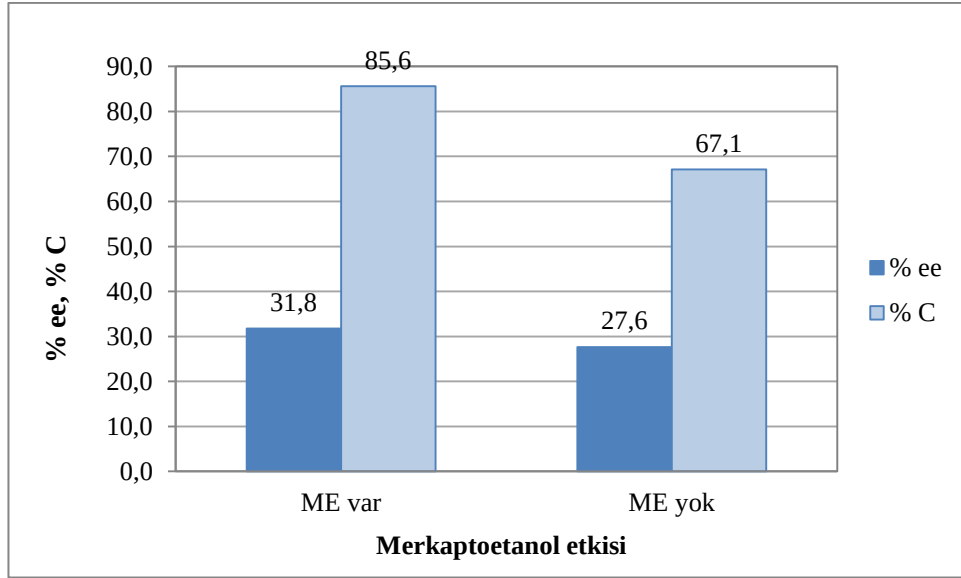


Şekil 4.76 Rasemik propranololün *R. oryzae* ile derasemizasyonunda 2. güne ait HPLC analiz sonucu (olası keton piki)



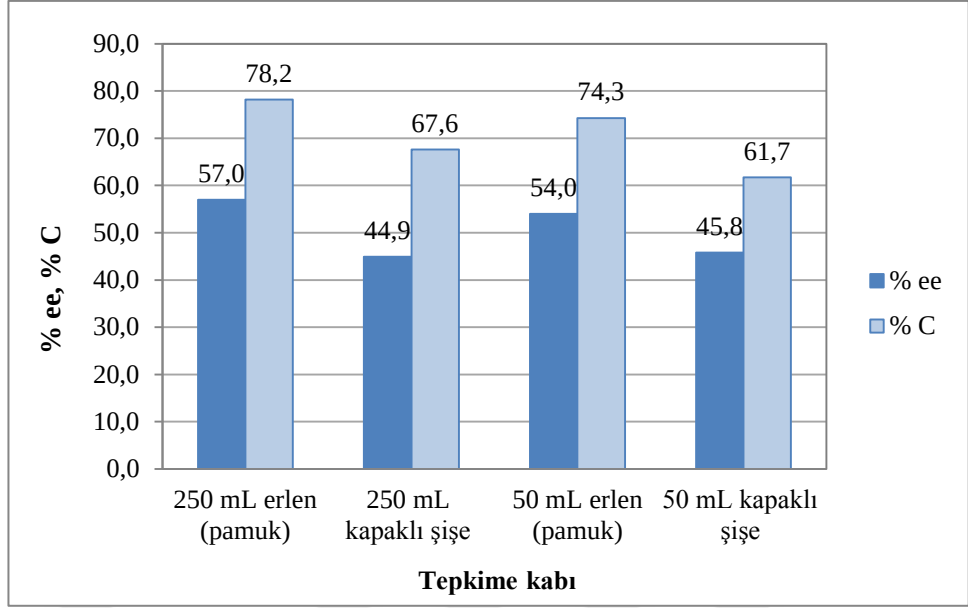
Şekil 4.77 Rasemik propranololün *R. oryzae* ile derasemizasyonunda farklı tepkime sürelerindeki HPLC analiz sonuçlarının karşılaştırılması (olası keton piki)

Şekil 4.18'den görüldüğü gibi tepkimenin ADH enzimi katalizörlüğünde ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimeleri üzerinden yürüdüğü düşünülmektedir. Bu nedenle, ADH aktivatörü olarak bilinen merkaptotanolün tepkime ortamına eklenerek etkisi gözlenmek istenmiştir. Bühner ve Sund'un (1969) yapmış oldukları çalışmada 50 mM merkaptotanolün ADH enzim aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu bilgisine dayanarak tepkime ortamına aynı derişimde merkaptotanol (ME) eklenmiştir. Bunun sonucunda elde edilen sonuç şekil 4.78'de verilmiştir. Buna göre ME bulunduğu durumda daha yüksek % ee ve % C değerleri elde edilmiştir. ME olmadığı durumda % ee ve % C değerleri sırasıyla 27.6; 67.1 iken tepkime ortamına 50 mM ME eklendiği durumda % ee=31.8 ve % C=85.6 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar da tepkimede ADH enziminin rol aldığı sonucunu desteklemektedir.



Şekil 4.78 Merkaptoetanol etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, $R. oryzae= 100$ g/L, 50 mM ME, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=150 rpm)

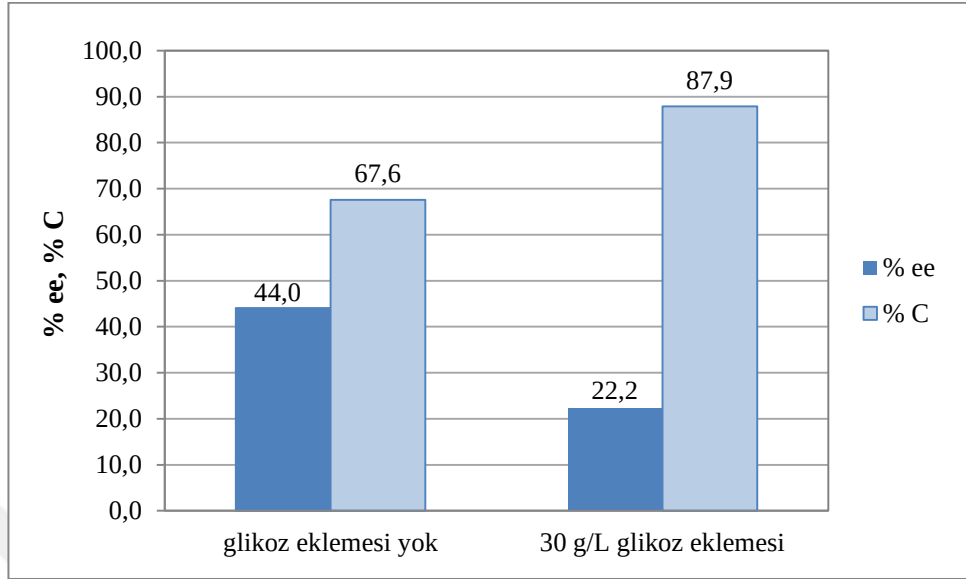
Şekil 4.18’de verilen tepkime serisinin ilk basamağının gerçekleşmesi için tepkimede rol aldığı düşünülen ADH enzimi kofaktöre ihtiyaç duymaktadır ve kofaktörler pahalıdır. Tepkimenin yürümesi için kofaktörün tepkimeye devamlı eklenmesi maliyetli olacağından kofaktör rejenerasyonunun sağlanması önem taşımaktadır. Bunun için rejenerasyonu sağlayacak NADH oksidaz enziminin yanında oksijen gereklidir. Bu nedenle, bu zamana kadar yapılan deneylerde tepkimeler; şekil 4.18’deki gibi tepkimede kofaktör rejenerasyonunun sağlanması ve O_2 ihtiyacının karşılanması için tepkime hacmi 10 mL olmasına rağmen 250 mL’lik ağzı pamuklu erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Fakat bu durumun gerçekten mekanizma için olumlu etki yapıp yapmadığını anlayabilmek için tepkimeler farklı tepkime kaplarında gerçekleştirilmiştir. 10 mL tepkime hacmi için tepkime kabı olarak 250 mL kapaklı şişe/ pamuklu erlen ve 50 mL kapaklı şişe/ pamuklu erlen kullanılarak tepkimeler gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.79’da verilmiştir. Buna göre en yüksek % ee ve % C değerleri sırasıyla % 57 ve % 78.2 olarak 250 mL’lik pamuklu erlen kullanıldığı durumda elde edilmiştir. Bu sonuç da daha fazla miktardaki O_2 ’nin tepkimeye olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca mekanizmanın düşünülen şekilde gerçekleştiğini desteklemektedir. Bu nedenle sonraki deneylerde tepkimeler 250 mL’lik pamuklu erlenlerde gerçekleştirilmeye devam edilmiştir.



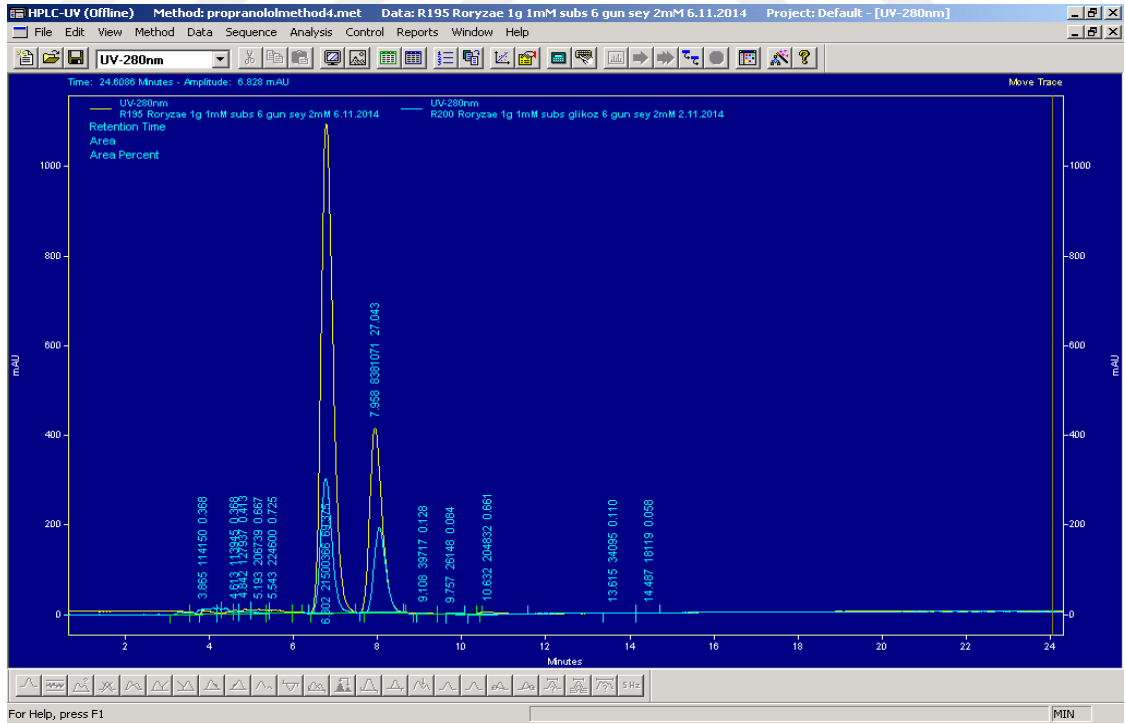
Şekil 4.79 Farklı tepkime kaplarının etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=120 rpm)

Şekil 4.18’de verilen gerçekleştiği düşünülen tepkime mekanizmasının ikinci adımında yer alan indirgenme tepkimesi sırasında kofaktör yükseltgenmektedir. Kofaktörün rejenerasyonu için ise bir hidrojen kaynağına ihtiyaç vardır. Bu tepkimelerde yaygın olarak kullanılan hidrojen kaynaklarından biri de glikozdur. Bu nedenle aynı koşullarda gerçekleştirilen bir tepkimeye glikoz ilave edilerek etkisi incelenmiştir. Benzer bir çalışmada (Ak 2013) bir sekonder alkol olan 1-fenil etanolün biyokatalitik derasemizasyonu sırasında kofaktör rejenerasyonu için glikoz derişiminin etkisi incelenmiş ve en uygun derişim 30 g/L olarak belirlenmiştir. Bu nedenle burada da tepkimeye 30 g/L derişiminde glikoz eklenmiştir. Fakat şekil 4.80’de görüldüğü üzere glikoz ilave edilen tepkimede % ee değeri daha düşüktür. Glikoz ilave edilen ve edilmeyen tepkimelerin HPLC analiz sonuçlarının karşılaştırılması şekil 4.81’de verilmiştir. Burada; mavi ile gösterilen eğri, glikoz varlığındaki tepkimede elde edilen sonucu gösterirken, sarı ile gösterilen eğri, aynı koşullarda gerçekleştirilen glikoz eklenmediği durumdaki tepkimede elde edilen analiz sonucudur. Şekil 4.81’deki analiz sonuçları glikoz varlığında S-enantiyomerinin dönüşümünün daha fazla gerçekleştiğini göstermektedir fakat glikoz ilave edilen durumda R enantiyomeri de dönüşmüş ve daha düşük % ee sonucu bulunmuştur. Buna göre hücre üreme ortamında bulunup hücreyle birlikte tepkime ortamına gelen glikozun kofaktör rejenerasyonu için yeterli olduğu,

eklenen glikozun % ee açısından olumsuz olduğu düşünülmektedir.

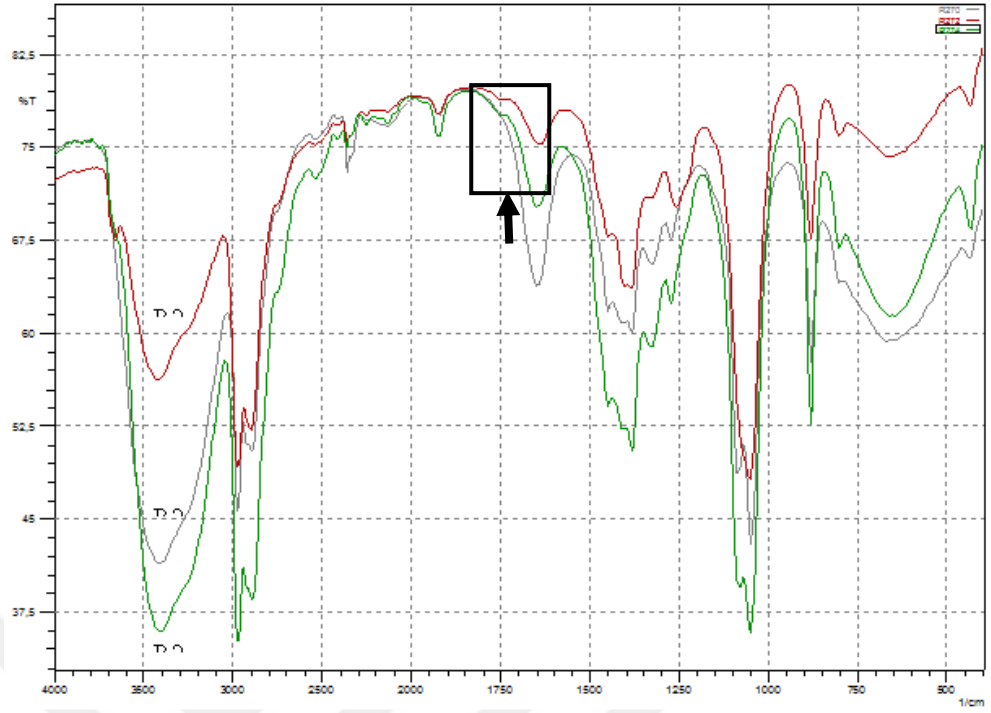


Şekil 4.80 Tepkime ortamına glikoz eklenmesinin etkisi ($C_0=1$ mM, $V=10$ mL, *R. oryzae*= 100 g/L, 30 g/L glikoz, pH=7, Süre = 6 gün, $T=30$ °C, KH=140 rpm)

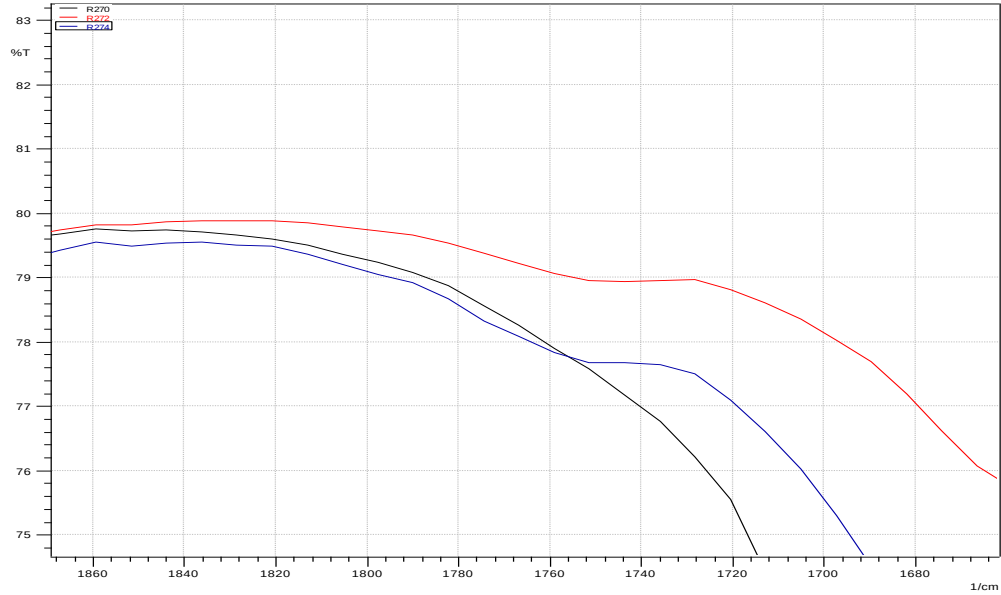


Şekil 4.81 Tepkime ortamına glikoz eklenmesinin etkisinin gözlemlendiği analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Bunun haricinde yine mekanizmayı aydınlatmak üzere substrat olarak saf R-propranolol ve saf S-propranolol ile tepkime gerçekleştirilmiş ve mekanizmanın hangisi üzerinden yürüdüğü anlaşılmaya çalışılmıştır. Bunun için 1 mM rasemik propranolol ile gerçekleştirilen tepkimede ortama eklenen rasemik propranolol 0.5 mM R ve 0.5 mM S-propranololden oluştuğundan tepkime 0.5 mM saf R-propranolol substrat olarak kullanılarak gerçekleştirildiğinde % ee=97 (R) olarak bulunmuştur. Yani R-enantiyomeri tepkimede dönüşmeden kalmaktadır. Bu da şekil 4.18’de verilen mekanizmayı desteklemektedir. Aynı şekilde tepkime bir de 0.5 mM saf S-propranolol substrat olarak kullanılarak gerçekleştirilmiş ve % ee=91.5 (S) % C=75 olarak bulunmuştur. Bu da tepkimenin S-propranolol üzerinden yürüdüğünü desteklemektedir. Bunların haricinde bir de kontrol deneyi olarak 1 mM rasemik propranolol substrat olarak kullanılarak aynı sürede (3 gün) tepkime gerçekleştirilmiş ve % ee=36.3 (R) % C=74 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlara göre R-enantiyomeri tepkimede dönüşmeden kalmakta, tepkime S-propranolol üzerinden yürümektedir. Bu bilgiler şekil 4.18’de verilen mekanizmayı desteklemektedir. Bir de, tepkimenin belirtilen mekanizma üzerinden yürüdüğünü desteklemek amacıyla ara ürün olarak oluştuğu düşünülen aminoketonun da tespit edilmesi gerekmektedir. Bu yüzden bu örneklere FTIR analizi yapılmış ve sonuçların karşılaştırılmış görüntüsü şekil 4.82’de verilmiştir. Burada görülen gri çizgi R-propranolol ile gerçekleştirilen tepkime, kırmızı çizgi S-propranolol ile gerçekleştirilen tepkime ve yeşil çizgi ise rasemik propranolol ile gerçekleştirilen tepkime sonucu FTIR analizini göstermektedir. 1690-1760 cm^{-1} dalga sayısı aralığında C=O bağlarının pikinin gözlemlendiği bilinmektedir. Şekil 4.82’den de görüldüğü gibi saf R-propranolol ile tepkime gerçekleştirildiğinde bu dalga sayısı aralığında bir pik gözlenmezken saf S-propranolol ile gerçekleştirilen tepkimede ve rasemik propranolol ile gerçekleştirilen tepkimede 1750 cm^{-1} dalga sayısında küçük bir pik gözlenmektedir. Bu bulgu da şekil 4.18’de verilen mekanizmayı desteklemektedir. Şekil 4.83’de ise bu bölgenin büyütülmüş görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.82 Substrat olarak 0.5 mM saf R-propranolol kullanıldığında (gri çizgi), 0.5 mM saf S-propranolol kullanıldığında (kırmızı çizgi), 1 mM rasemik propranolol kullanıldığında (yeşil çizgi) gerçekleştirilen tepkimelerin FTIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması

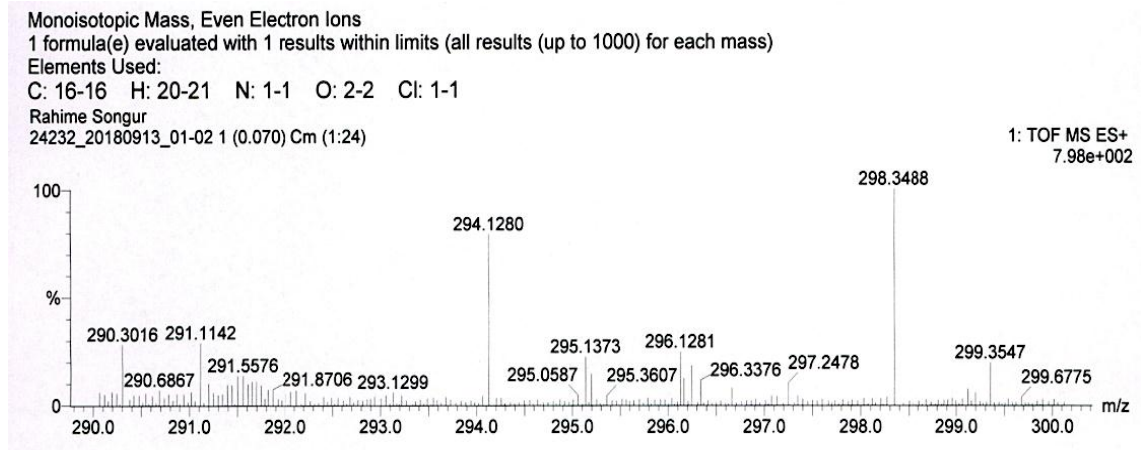


Şekil 4.83 Substrat olarak 0.5 mM saf R-propranolol kullanıldığında (siyah çizgi), 0.5 mM saf S-propranolol kullanıldığında (kırmızı çizgi), 1 mM rasemik propranolol kullanıldığında (mavi çizgi) gerçekleştirilen tepkimelerin FTIR analiz sonuçlarının karşılaştırılması

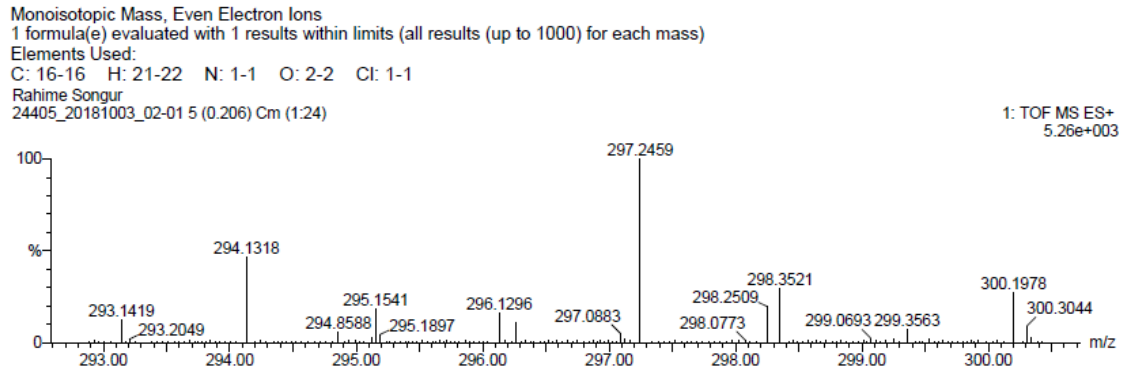
Bir de bu mekanizmanın keton üzerinden yürüdüğünü ispatlamak amacıyla bu örneklerin Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (HRMS) analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.84'te verilen rasemik propranololle gerçekleştirilen tepkimenin analizinde pozitif modda $m/z = 294.1280$ olarak keton molekülü saptanmıştır.

Saf R propranolol ile gerçekleştirilen tepkimenin HRMS analizi sonucunda keton molekülüne rastlanmazken, saf S-propranolol ile gerçekleştirilen tepkimenin analizinde pozitif modda $m/z = 294.1318$ olarak keton molekülü saptanmıştır (Şekil 4.85).

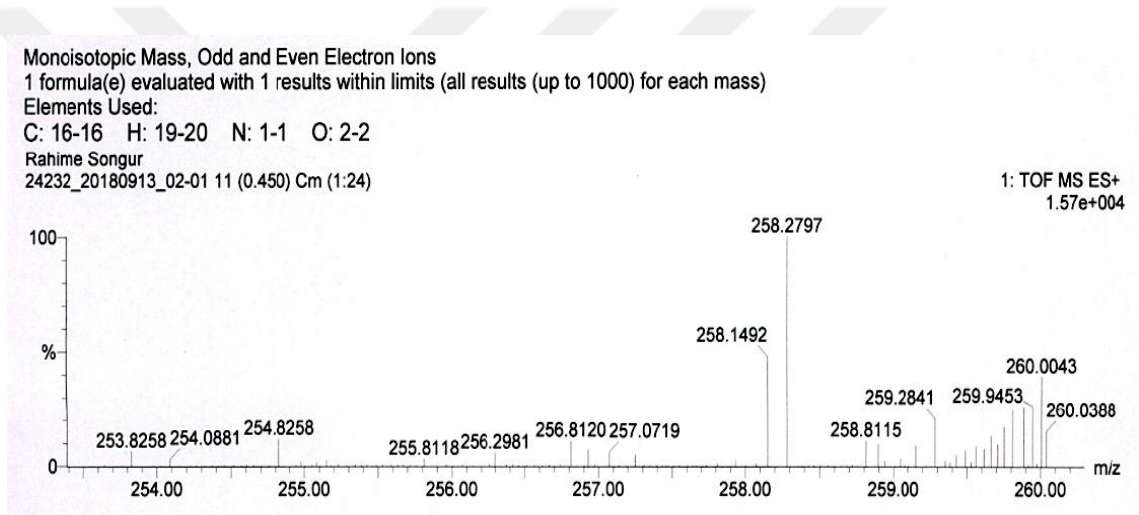
Bununla birlikte teyit amaçlı olarak bir de RSM deneylerinde yüksek % ee değeri elde edilen örneğin de HRMS analizi yaptırılmış ve elde edilen analiz sonucu şekil 4.86'da verilmiştir. Buna göre bu örnekte de pozitif modda $m/z = 258.1492$ olarak keton molekülü saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar da şekil 4.18'de verilen mekanizmayı desteklemektedir.



Şekil 4.84 Substrat olarak 1 mM rasemik propranolol kullanıldığında elde edilen HRMS analiz sonucu



Şekil 4.85 Substrat olarak 0.5 mM saf S-propanolol kullanıldığında elde edilen HRMS analiz sonucu



Şekil 4.86 RSM’de yüksek sonuç elde edilen bir örneğin HRMS analiz sonucu

5. SONUÇ

Bu doktora çalışmasında, farmasötik açıdan önem taşıyan β -blokerlardan biri olan propranololün enantiyomerik saflıkta üretimi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda doktora çalışması kapsamında, haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü maddesi olan halohidrinlerin üretimi ve rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi olmak üzere iki yöntem incelenmiştir.

5.1 Haloketonların Seçimli Mikrobiyal İndirgenmesi ile Propranololün Öncü Maddesi Olan Halohidrinlerin Üretimi

1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-onun (haloketon) mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün öncü bileşeni olan 1-kloro-3-(1-naftiloksi)propan-2-olün (halohidrin) enantiyomerik saflıkta üretiminde tepkimede kullanılacak olan haloketon ticari olarak bulunmadığından kimyasal olarak sentezlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle ilk olarak haloketonun sentezinde gerekli olan halohidrinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen bu halohidrin ve haloketon numunelerinin NMR analizleri yapılmış ve halohidrinin sentezinin gerçekleştiği fakat haloketonun sentezinin gerçekleşmediği anlaşılmıştır. Kimyasal olarak sentezlenen bu maddelerin HPLC’de analizleri gerçekleştirilmiş ve özellikle NMR analizi ile sentezlendiği doğrulanan halohidrinin analizi üzerinde incelemeler yapılmıştır. Bunun yanında haloketon sentezi gerçekleştiğinde indirgenme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılmak üzere mikroorganizma seçimi yapılmıştır. Literatürden edinilen bilgiye göre indirgenme tepkimesini yüksek seçimlilikle (R-seçimli olarak) katalizleyen *Pichia mexicana* (CECT 11015) mikroorganizmasının kullanılmasına karar verilmiştir. Bu mikroorganizma temin edilmiş ve hücre üreme eğrisi oluşturulmuştur. Haloketon sentezi konusunda başarıya ulaşıldığında indirgenme tepkimesinde kullanılacak olan mikroorganizma hazır hale getirilmiştir.

Ayrıca, haloketon sentezinin neden gerçekleşmediği araştırılarak, farklı denemeler yapılmıştır. Denenen farklı yöntemler sonucunda ^{13}C NMR analizleri ve yapıda

oluşması beklenen fakat oluşmayan karbonil grubunun (C=O) ^{13}C NMR’da gözükmebileceği bilgisinden yola çıkarak ^1H NMR analizleri yapılmış ve sentezlenen örneklerle ait sonuçlarda çok fazla safsızlık olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte yapıları aydınlatmaya yönelik olarak bir de IR analizleri gerçekleştirilmiş ve alkole (halohidrin) ait analiz sonuçlarında hidroksil grubunun olduğu, fakat haloketona ait analiz sonuçlarında karbonil grubunun oluşmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla ^{13}C NMR, ^1H NMR, IR analiz sonuçları birbiriyle uyumludur. Tüm şartlar hazır hale getirilmiş olsa da (biyokatalizör, HPLC analiz yöntemi, haloketon sentezinde kullanılacak olan halohidrin sentezi) gerçekleştirilecek olan tepkime için substrat (haloketon) sentezlenemediğinden haloketonun mikrobiyal indirgenme tepkimesi gerçekleştirilememiştir.

Haloketon sentezi gerçekleştirildiğinde tepkime için ADH enzim kaynağı olarak kullanılacak en uygun mikroorganizma olarak seçilen *P. mexicana*’nın önceden çoğaltılmış serbest hücreleri ile kesikli biyoreaktörlerde, haloketonun stereoseçimli indirgenmesiyle kiral halohidrin üretimi gerçekleştirilecekti. Fakat haloketon sentezi gerçekleştirilemediğinden haloketonların seçimli mikrobiyal indirgenmesi ile propranololün çıkış maddesi olan halohidrinlerin üretimi yöntemi bırakılarak çalışmalar rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi üzerine yoğunlaştırılmıştır.

5.2 Rasemik Propranololün Biyokatalitik Derasemizasyonu

Propranololün enantiyomerik saflıkta elde edilmesi için farklı türde mikroorganizmalar (*Lactobacillus kefir* NRRL B-1839, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* CBS 111718, *Rhodotorula glutinis* DSM 70398, *Lactobacillus brevis*, *Rhizopus arrhizus* NCIM 997 ve *Geotrichum candidum* NCIM 980) kullanılarak rasemik propranololün derasemizasyonunu gerçekleştirmek için uygun mikroorganizma belirlenmeye çalışılmıştır. Hücre içi olan enzimlerin hücre dışına çıkarak tepkimede iç kütle aktarım kısıtlamalarının azaltılması için, tüm bu mikroorganizmalar farklı parçalama yöntemleriyle parçalanarak üreme ve tampon ortamında tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda en yüksek enantiyomerik aşırılık (ee) değerleri, bir küf

mantarı olan *R. oryzae* CBS 111718 mikroorganizması ile tampon ortamında gerçekleştirilen tepkimelerde elde edilmiştir. Ayrıca aynı mikroorganizma farklı bir üreme ortamında üretilerek aynı tepkimede kullanılmıştır. Fakat bu durumda % ee değerleri düşük bulunmuştur. Bu durum enzim kaynağı olarak kullanılan mikroorganizmaların üreme ortamlarının bileşimlerinin istenen enzim açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer mikroorganizmalarla yapılan deneylerde % ee değerleri çok düşük olarak bulunmuştur. Bu da o mikroorganizmaların, gerçekleştirilmek istenen mekanizma için istenen enzimler olan ADH ve NADH oksidaz enzimlerini içerse bile tepkimede seçimli davranmadığını göstermektedir.

Rhizopus oryzae mikroorganizması ile tepkimenin yüksek % ee ve % C ile gerçekleşmesi için en uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; SÖD uygulandığı ve uygulanmadığı durum için farklı tepkime parametrelerinin etkisi incelenmiştir. SÖD uygulandığı durumda en uygun tepkime parametrelerinin belirlenmesi için substrat derişimi, tepkime süresi, tepkime ortamının pH'ı, SÖD uygulama süresi gibi farklı parametrelerin tepkimeye etkileri incelenmiştir. Bunun sonucunda, en uygun parametreler; substrat derişimi 3 mM, tepkime süresi 6 gün, tepkime ortamının (fosfat tamponu) pH'ı 7, ses ötesi dalga (SÖD) uygulama süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir.

SÖD uygulanmadığı koşulda incelenen parametrelerden hücre ile ilgili olanlar; farklı katı ve sıvı üreme ortamı, sıvı üreme ortamının pH'ı, üreme sıcaklığı, hücreyi stoklama sıcaklığının etkisi, stoklama yöntemi, farklı spor çözeltileri, biyotransformasyon için mikroorganizmayı parçalama yöntemi, mikroorganizmanın parçalanma durumu, mikroorganizmanın tamponla yıkanma durumu ve sayısı olarak sıralanabilir. Biyotransformasyon ortamıyla ilgili olanlar ise substrat derişimi, hücre derişimi, karıştırma hızı, tepkime ortamının (fosfat tamponunun) pH'ı, tepkime ortamının sıcaklığı, tepkime süresi, tepkime kabı gibi parametrelerdir. Bu kapsamda; en yüksek % ee değerleri katı üreme ortamı olarak glikozlu MEA ortamı kullanıldığında, pH'ı 6 olan sıvı üreme ortamında üretildiğinde, üreme ortam sıcaklığı 25 °C olduğunda, SÖD ya da mekanik parçalamayla değil, sadece küçük parçalara ayrıldığında, tepkimede kullanılmadan önce tamponla 1 defa yıkandığı durumda elde edilmiştir. Hücreyi

stoklama yöntemi olarak boncuklarda stoklamanın daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Biyotransformasyon ortam koşullarının etkisi incelendiğinde en yüksek % ee değerleri; 1 mM substrat derişimde, 100 g/L hücre derişiminde, 120 rpm karıştırma hızında, hücreler pH'ı 7 olan tepkime ortamında (fosfat tamponu), 250 mL pamuklu erlen kullanıldığında elde edilmiştir. Tepkime süresi olarak 6 günün yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Rasemik propranololün *R. oryzae* ile biyokatalitik derasemizasyonuna farklı tepkime parametrelerinin etkilerinin ayrı ayrı incelenmesinin ardından, çeşitli tepkime parametrelerinin etkilerinin eşanlı incelenerek en yüksek % ee değerini sağlayabilecek optimum değerlerin elde edilmesi için, parametreler arasındaki etkileşimlerin de dikkate alınabildiği deneysel tasarım yöntemleri kullanılmıştır.

Her seferinde tek bir parametrenin değiştirildiği klasik deneysel yöntemler ile yapılan önceki deneylerin sonuçları incelendiğinde biyotransformasyon tepkime ortamını en çok etkileyen 6 parametrenin (substrat derişimi, hücre derişimi, tepkime ortamının pH'ı, sıcaklık, karıştırma hızı, süre) optimizasyonunun yapılmasına karar verilmiştir. Fakat Cevap Yüzey Yöntemi ile 6 faktör için deney sayısı çok fazla olduğundan ilk olarak Plackett Burman Yöntemi kullanılarak en etkili parametreler belirlenmiş, daha sonra da belirlenen parametrelerle Cevap Yüzey Yöntemi uygulanmıştır. Her iki deneysel tasarım yöntemi de Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak uygulanmıştır.

Plackett Burman Yöntemi uygulanarak ANOVA sonuçları ve Pareto Grafiği'ne göre biyotransformasyon ortamını etkileyen en etkili üç parametre pH, süre, mikroorganizma derişimi olarak belirlenmiştir. Ayrıca Pareto Grafiği'nden her bir parametrenin cevap değeri üzerine pozitif ya da negatif etkileri saptanmıştır. Buna göre; incelenen 6 parametreden pH, süre, mikroorganizma derişimi, karıştırma hızı ve sıcaklığın artması cevap değeri olan % ee değerine pozitif etki gösterirken, substrat derişiminin artması negatif etki göstermiştir. Bu bilgi, Cevap Yüzey Yöntemi için belirlenen en etkili parametrelerin seviyelerinin belirlenmesinde ve Cevap Yüzey Yöntemi haricinde tutulan parametrelerin tasarımda hangi değerde sabit tutulması gerektiği konusunda

kullanılmıştır. Cevap Yüzey Yöntemi'nde modifiye edilmiş Box-Behnken Tasarımı kullanılmıştır. Bu tasarıma göre yapılan deney sonuçları programa girildikten sonra cevap değeri olan % ee için analizlenmiş, uygun olan cevap modeli kuadratik model (ikinci dereceden polinom modeli) olarak belirlenmiştir.

Program tarafından hesaplanan istatistiksel veriler değerlendirilmiş ve cevap yüzey grafikleri elde edilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre; modelin F değerinin (936.74) yüksek olması ve modelin p (olasılık) değerinin (<0.0001) 0.05'ten küçük olması modelin % 95 güven seviyesinde, istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu ve matematiksel modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir (Murthy vd. 2000, Bezerra vd. 2008). Bunun yanında ANOVA sonuçlarına göre uyum eksikliğinin (lack of fit) önemsiz çıkması da model eşitliğinin % ee değerini yeterli derecede tahmin ettiğini yani modelin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermektedir (Gajdhane vd. 2016). RSM sonucunda elde edilen standart sapma değerinin (0.53) küçük olması, verilerin ortalamaya yakın olduğunu göstermiştir. Modelin R^2 değeri 0.9992 olarak bulunmuştur. R^2 değeri gözlenen ve tahmin edilen cevap değerleri arasındaki ilişkiyi, yani polinomik modelin verilerle ne kadar uyumlu olduğunu gösterir. R^2 değerinin 0.75'ten büyük olması modelin uygunluğunu gösterir. İyi bir istatistiksel modelin R^2 değeri 1'e yakın olmalıdır. Ayrıca düzeltilmiş R^2 (adjusted R^2) ve tahmini R^2 (predicted R^2) değerlerinin birbirlerine yakın değerler olması istenir (Niladevi vd. 2009, Yang vd. 2017). Bu çalışmada da düzeltilmiş R^2 değeri 0.9981 ve tahmini R^2 değeri 0.9873 olarak bulunmuştur. R^2 değerlerinin mikrobiyal bir çalışmada bu şekilde yüksek bulunması önem taşımaktadır.

ANOVA sonuçlarına göre; modeldeki tüm terimlerin p değerinin <0.05 olduğu ve böylece A (pH), B (süre), C (mikroorganizma derişimi), A^2 (pH^2), B^2 ($süre^2$), C^2 ($mikroorganizma\ derişimi^2$) ve AB, AC, BC ikili etkileşimlerinin modeldeki önemli terimler olduğu belirlenmiştir.

Model denklemi kullanılarak oluşturulan ve % ee cevap değerine bağımsız değişkenler olan parametrelerin ikili etkilerini gösteren üç boyutlu cevap yüzey grafikleri ve izohips

eğrileri incelenmiştir. Özellikle izohips eğrilerini içeren grafiklerde % ee'nin maksimum olduğu bölge net bir şekilde gözükmemektedir. Bu da; Cevap Yüzey Yöntemi parametre seviyelerinin doğru seçildiğini göstermektedir.

Cevap Yüzey Yöntemine göre % ee değerini maksimize eden parametre değerleri: pH=6.86, süre=5.36 gün, mo derişimi=101 g/L olarak belirlenmiştir. Bu koşulda öngörülen cevap: % ee= 54.72 iken yapılan deney sonucunda % ee =52.30 olarak bulunmuştur. Birbirine yakın sonuçlar elde edilmesi, RSM sonucu ile elde edilen denklemin tepkime için uygun olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte optimum tepkime parametrelerinin merkez noktaya çok yakın olduğu görülmektedir. Bu durum da tasarımın aralıklarının iyi seçildiğini göstermektedir.

Literatürde sekonder amino alkollerin derasemizasyonu ile ilgili sadece bir çalışma olduğu için, bu çalışmada gerçekleşen mekanizmayı anlayabilmek için çoklu enzim sistemi ile çeşitli sekonder alkollerin biyokatalitik derasemizasyonu ile ilgili çalışmalar incelenmiştir. Farklı sekonder alkollerle yapılan çalışmalarda, genel olarak cazip bulunan biyokatalitik derasemizasyon yöntemiyle tepkimenin gerçekleşip gerçekleşmemesine ve üretilen ürünün % ee'sini artırmaya yönelik araştırmalar yapılsa da bu çalışmaların hiçbirinde deneysel tasarım yöntemleri uygulanmamıştır. Sekonder alkollerle ilgili bile bu çalışmalar yapılmamışken bu çalışmada farmasötik açıdan önem taşıyan sekonder amino alkollerden biri olan propranololün biyokatalitik derasemizasyonu incelenmiş ve deneysel tasarım yöntemleri ile tepkime parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Bu durum, yapılan çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

Çalışmada ayrıca, tepkimenin gerçekleşme mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır. Bunlar; tepkimedeki bileşenlerin miktarlarının zamanla değişiminin incelenmesi, tepkime ortamına ADH aktivatörü olarak kullanıldığı bilinen merkaptotanolün eklenmesinin, kosubstrat olarak glikoz ve tepkime ortamındaki oksijenin etkisinin incelenmesi, saf R ve saf S propranolol ile tepkimenin gerçekleştirilerek HPLC, FTIR ve HRMS analizlerinin karşılaştırılarak mekanizma

hakkında yorum yapılması olmuştur. Bu çalışmalar sırasında, ADH aktivatörü olduğu bilinen merkaptotetanölün tepkime üzerine olumlu etkisinin olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç da tepkime ADH enziminin rol aldığı yönündeki tahmini desteklemektedir. Kofaktör rejenerasyonu için tepkime ortamına kosubstrat olarak eklenen glikozun enantiyoseçimliğe olumsuz etkisi olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle hücre üreme ortamında bulunan glikozun kofaktör rejenerasyonu için yeterli olduğu, glikoz eklenmesine gerek olmadığı sonucuna varılmıştır. Tepkime ortamındaki oksijenin etkisi incelendiğinde ortamdaki oksijen miktarının artması % ee'nin artmasına sebep olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç da önerilen mekanizmayı desteklemektedir. Bunun dışında saf R ve saf S propranolol substrat olarak kullanılarak tepkimeler gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlardan tepkime R-enantiyomerinin dönüşmeden kaldığı ve tepkimenin S-propranolol üzerinden yürüdüğü gözlenmiştir. Bu sonuç FTIR ve HRMS sonuçlarıyla doğrulanmıştır. Bu bilgiler şekil 4.18'de önerilen mekanizmayı desteklemektedir.

Propranololün enantiyomerik saflıkta elde edilmesi için çevre dostu bu yöntemle ilgili literatürde sadece tek bir çalışma (Damle vd. 2000) bulunmakla beraber, kapsamı oldukça kısıtlıdır. Bahsi geçen çalışmada farklı iki mikroorganizma kullanılmış ve sadece süre ile pH etkisi incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda S-propranolol elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, tepkimenin gerçekleşme mekanizmasına ya da hangi enzimler tarafından katalizlendiğine dair de hiçbir bilgi bulunmamaktadır. *Rhizopus oryzae* CBS 111718 mikroorganizması ile gerçekleştirilen bu çalışmada ise tepkimeyi etkileyen parametreler etraflıca incelenmiş ve deneysel tasarım yöntemleriyle parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında tüm tepkimelerde R-propranolol elde edilmiştir. Burada, rasemik propranololün derasemizasyonu hücre içinde bulunan ADH ve NADH oksidaz enzimleri katalizörlüğünde ardışık yükseltgenme-indirgenme tepkimeleriyle gerçekleşmektedir.

Dehidrojenaz ve NAD(P)H oksidaz çiftinin kullanılmasının benzer sistemlerin üzerinde birçok avantajı vardır:

- Tersinmez NADH oksidaz katalizli tepkime, dengeyi dehidrojenaz katalizli yükseltgenmeye çevirerek tepkimenin tamamlanmasını sağlar.

- Dehidrojenazların yaygın spesifikliği, çok iyi kimyasal, bölgesel ve enantiyoseçimliliği seçimlilik problemini çözer fakat temel problemi, dönüşümün optimizasyonu olarak bırakır.
- Kompleks ve pahalı yükseltgenlere de, metal ya da halojenlenmiş bileşiklere de gerek yoktur (Hall ve Bommarius 2011).

Bu çalışmada, tüm hücre kullanımı ile pahalı kofaktörlere ihtiyaç duyulmadan hücre içi kofaktör rejenerasyonu sağlanarak ekonomik bir proses gerçekleştirilmiştir. Böylece tek tepkime kabında, ara ürün olan prokiral ketonu ayırmaya ihtiyaç olmaksızın ardışık tepkimelerle çevre dostu bir proses gerçekleşmiştir.

Rasemik propranololün biyokatalitik derasemizasyonunun incelendiği bu çalışma sırasında kullanılan farklı türdeki mikroorganizmalar arasından bir küf mantarı olan *R. oryzae* CBS 111718 ile en yüksek % ee değerleri elde edilmiştir. Hücre üreme koşullarının ve tepkime parametrelerinin etkisi ile ilgili çeşitli deneyler yapılmıştır. Biyotransformasyon için farklı tepkime parametrelerinin etkilerinin ayrı ayrı incelenmesinin ardından, çeşitli tepkime parametrelerinin etkilerinin eşanlı incelenerek en yüksek % ee değerini sağlayacak optimum koşulların belirlenmesi için, deneysel tasarım yöntemleri kullanılmıştır. Bunun sonucunda, belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen tepkime sonucunda % ee=52.3 olarak elde edilmiştir. Bu değeri artırmak için, hücrede bulunan başka enzimler tarafından gerçekleştiği düşünölen farklı tepkimeleri önlemek için ortama proteaz inhibitörü katılmasının etkisi araştırılabilir. Ayrıca kofaktör rejenerasyonu için gerekli olan NADH oksidaz enziminin ortamdaki oksijen ile birlikte hidrojen peroksit oluşturma ihtimaline karşı, ortama hidrojen peroksiti parçalayan katalaz enziminin eklenmesi incelenebilir. Bunların dışında bir de, tepkime ortamındaki biyokatalizör miktarını artırmak için hücre liyofilize edilip tepkimede kullanılabilir. Fakat bu proste kofaktör rejenerasyonunun gerçekleşmesi önem taşıdığından hücrenin içinde bulunan kofaktörlerin tepkime ortamına gelebilmesi için hücre üretildikten sonra farklı bileşimleriyle (katı kısım, sıvı kısım, karışık) liyofilize edilip etkisinin araştırılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agranat, I., Wainshtein, S.R. and Zusman, E.Z. 2012. The predicated demise of racemic new molecular entities is an exaggeration. *Nature Reviews/Drug Discovery*, 11, 972-973.
- Agrawal, Y.K. and Patel, R.N. 2005. Chiral chromatographic separation of β -blockers. *Journal of Chromatography B*, 820, 23-31.
- Agustian, J., Kamaruddin, A.H. and Bhatia, S. 2010. Single enantiomeric β -blockers-The existing technologies. *Process Biochemistry*, 45, 1587-1604.
- Ak, P. 2013. Rasemik-1-feniletanolün biyokatalitik derasemizasyonu ile enantiyomerik saflıkta 1-feniletanol üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Akbar, S. and Alsharidah, M.S. 2014. Are beta blockers new potential anticancer agents? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(22), 9567-9574.
- Alalla, A., Khelassi, M.M., Riant, O. and Zouiouche, L.A. 2016. Easy kinetic resolution of some β -amino alcohols by *Candida antarctica* lipase B catalyzed hydrolysis in organic media. *Tetrahedron: Asymmetry*, 27(24), 1253-1259.
- Albarrán-Velo, J., González-Martínez, D. and Gotor-Fernández, V. 2018. Stereoselective biocatalysis: A mature technology for the asymmetric synthesis of pharmaceutical building blocks. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(2), 102-130.
- Allan, G.R. and Carnell, A.J. 2001. Microbial deracemization of 1-aryl and 1-heteroaryl secondary alcohols. *Journal of Organic Chemistry*, 66(19), 6495-6497.
- Al-Majed, A.A., Bakheit, A.H.H., Abdel-Aziz, H.A., Alajmi, F.M. and AlRabiah, H. 2017. Propranolol, In: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. Brittain, H.G. (ed), Elsevier, 42, 287-333.
- Amrutkar, S.M., Banoth, L. and Banerjee, U.C. 2013. One-pot synthesis of (R)-1-(1-naphthyl)ethanol by stereoinversion using *Candida parapsilosis*. *Tetrahedron Letters*, 54, 3274-3277.
- Anonim. 2016. Web Sitesi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim>, Erişim Tarihi: 21.3.2016.
- Anonim. 2018. Web Sitesi: <http://www.oytunerbas.com.tr/farmakoloji-giris-otonom-sinir-sistemi/17/>, Erişim Tarihi: 06.09.2018.

- Anonymous. 2013. Web Sitesi: [https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C20133931&Type=IR SPEC&Index=0#IR-SPEC](https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C20133931&Type=IR%20SPEC&Index=0#IR-SPEC), Erişim Tarihi: 25.2.2013.
- Anonymous. 2015. Web Sitesi: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri33.htm>, Erişim Tarihi: 26.11.2015.
- Anonymous. 2018. Web Sitesi: <https://docplayer.net/15536477-Using-beta-blockers-to-treat-high-blood-pressure-and-heart-disease.html>, Erişim Tarihi: 20.9.2018.
- Anonymous. 2018. Web Sitesi: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, Erişim Tarihi: 5.10.2018.
- Anonymous. 2018. Web Sitesi: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p0884?lang=en®ion=TR>, Erişim Tarihi: 9.11.2018.
- Aytar, P., Buruk, Y. ve Çubuk, A. 2013. *Streptococcus equi* ile hyaluronik asit üretiminde optimum koşulların Plackett Burman yöntemi ile belirlenmesi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 11(1), 28-35.
- Barbosa, O., Ariza, C., Ortiz, C. and Torres, R. 2010. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). New Biotechnology, 27(6), 844-850.
- Bezerra, M.A., Santellia, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. and Escalera, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76, 965-977.
- Brereton, R.G. 2003. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley & Sons, 77 p., UK.
- Bühner, M. and Sund, H. 1969. Yeast alcohol dehydrogenase: -SH groups, disulfide groups, quaternary structure, and reactivation by reductive cleavage of disulfide groups. European Journal of Biochemistry, 11, 73-79.
- Calcaterra, A. and D'Acquarica, I. 2018. The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 147, 323-340.
- Campo, C., Llama, E.F., Bermúdez, J.L. and Sinisterra, J.V. 2001. Methodologies for the stereoselective synthesis of adrenergic β -blockers: an overview, Biocatalysis and Biotransformation, 19(3), 163-180.
- Carballeira, J.D., Alvarez, E., Campillo, M., Pardo, L. and Sinisterra, J.V. 2004. *Diplogelasma grovesii* IMI 171018, a new whole cell biocatalyst for the stereoselective reduction of ketones. Tetrahedron: Asymmetry, 15, 951-962.

- Cardus, G.J., Carnell, A.J., Trauthwein, H. and Riermeir, T. 2004. Microbial deracemisation of N-(1-hydroxy-1-phenylethyl)benzamide. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 239-243.
- Cazetta, T., Moran, P.J.S. and Rodrigues, J.A.R. 2014. Highly enantioselective deracemization of 1-phenyl-1,2-ethanediol and its derivatives by stereoinversion using *Candida albicans* in a one-pot process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109, 178-183.
- Cea, G., Wilson, L., Bolivar, J.M., Markovits, A. and Illanes, A. 2009. Effect of chain length on the activity of free and immobilized alcohol dehydrogenase towards aliphatic alcohols. *Enzyme Microb. Technol.*, 44, 135-138.
- Chiou, T.W., Chang, C.C., Lai, C.T. and Tai, D.F. 1997. Kinetic resolution of propranolol by a lipase-catalyzed N-acetylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7(4), 433-436.
- Comasseto, J.V., Andrade, L.H., Otori, Á.T., Assis, L.F. and Porto, A.L.M. 2004. Deracemization of aryl ethanol and reduction of acetophenones by whole fungal cells of *Aspergillus terreus* CCT 4083, *A. terreus* CCT 3320 and *Rhizopus oryzae* CCT 4964. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29, 55-61.
- Damle, S.V., Patil, P.N. and Salunkhe, M.M. 1999. Chemoenzymatic synthesis of R and S-atenolol and propranolol employing lipase catalysed enantioselective esterification and hydrolysis. *Synthetic Communications*, 29(22), 3855-3862.
- Damle, S.V., Patil, P.N. and Salunkhe, M.M. 2000. Biotransformations with *Rhizopus arrhizus* and *Geotrichum candidum* for the preparation of (S)-atenolol and (S)-propranolol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8, 2067-2070.
- Dholariya, Y.N., Bansod, Y.B., Vora, R.M., Mittal, S.S., Shirsat, A.E. and Bhingare, C.L. 2014. Design and optimization of bilayered tablet of hydrochlorothiazide using the quality-by-design approach. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 4(2), 93-101.
- Eisa, M., El-Refai, H. and Amin, M. 2016. Single step biotransformation of corn oil phytosterols to boldenone by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Reports*, 11, 36-43.
- Escorcía, B.M., Daza, M.C. and Doerr, M. 2014. Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 21-31.
- Gajdhane, S.B., Bhagwat, P.K. and Dandge, P.B. 2016. Statistical media optimization for enhanced production of α -galactosidase by a novel *Rhizopus oryzae* strain SUK. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 301-309.

- Geueke, B., Riebel, B. and Hummel, W. 2003. NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 205-211.
- Gowda, L.R., Bachhawat, N. and Bhat, S.G. 1991. Permeabilization of Bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(2), 154-157.
- Gökçe, B. ve Taşgetiren, S. 2009. Kalite için deney tasarımı. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 6(1), 71-83.
- Gruber, C.C., Lavandera, I., Faber, K. and Kroutil, W. 2006. From a racemate to a single enantiomer: deracemization by stereoinversion. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348, 1789-1805.
- Gupta, P. and Mahajan, N. 2018. Biocatalytic approaches towards the stereoselective synthesis of vicinal amino alcohols. *New Journal of Chemistry*, 42, 12296-12327.
- Hall, M. and Bommarius, A.S. 2011. Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions. *Chemical Reviews*, 111, 4088-4110.
- Hummel, W. and Riebel, B. 2003. Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 25(1), 51-54.
- Kamal, A., Sandbhor, M. and Shaik, A.A. 2004. Chemoenzymatic synthesis of (S) and (R)-propranolol and sotalol employing one-pot lipase resolution protocol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4581-4583.
- Kara, D. 2014. Anesteziyoloji ve reanimasyon yoğun bakım ünitesinde beta bloker kullanımının mortalite ve morbidite üzerine etkileri. *Tıpta Uzmanlık Tezi*. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Ankara.
- Karume, I., Takahashi, M., Hamdan, S.M. and Musa, M.M. 2016. Deracemization of secondary alcohols by using a single alcohol dehydrogenase. *ChemCatChem Communications*, 8, 1459-1463.
- Kennedy, H.L. 2001. Current utilization trends for β -blockers in cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine*, 110(5A), 2-6.
- Kong, X.D., Yu, H.L., Yang, S., Zhou, J., Zeng, B.B. and Xu, J.H. 2015. Chemoenzymatic synthesis of (R)- and (S)-propranolol using an engineered epoxide hydrolase with a high turnover number. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 275-281.

- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K. and Faber, K. 2004. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(2), 120-126.
- Kumar, P., Pai, K., Pandey, H.P. and Sundar, S. 2002. NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients. *Journal of Medical Microbiology*, 51, 832-836.
- Kumar, R., Banoth, L., Banerjee, U. and Kaur, J. 2016. Enantiomeric separation of pharmaceutically important drug intermediates using a metagenomic lipase and optimization of its large scale production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 995-1003.
- Li, Y.L., Xu, J.H. and Xu, Y. 2010. Deracemization of aryl secondary alcohols via enantioselective oxidation and stereoselective reduction with tandem whole-cell biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, 48-52.
- Li, B., Nie, Y., Mu, X.Q. and Xu, Y. 2016. Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 129, 21-28.
- Mantovani, S.M., Angolini, J.F.F. and Marsaioli, A.J. 2009. Mechanistic investigation of the *Candida albicans* CCT 0776 stereoinversion system and application to obtain enantiopure secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 2635-2638.
- Martinez, F., Campo, C.D., Sinisterra, J.V. and Llama, E.F. 2000. Preparation of halohydrin β -blocker precursors using yeast-catalysed reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 4651-4660.
- Martinez Lagos, F., Campo, C.D., Llama, E.F. and Sinisterra, J.V. 2002. New yeast strains for enantioselective production of halohydrin precursor of (S)-propranolol. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 895-901.
- Martinez Lagos, F., Carballeira, J.D., Bermudez, J.L., Alvarez, E. and Sinisterra, J.V. 2004. Highly stereoselective reduction of haloketones using three new yeasts: application to the synthesis of (S)-adrenergic β -blockers related to propranolol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 763-770.
- Martinez Lagos, F. and Sinisterra, J.V. 2005. Enantioselective production of halohydrin precursor of propranolol catalysed by immobilized yeasts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 36, 1-7.
- Matsuda, T., Yamanaka, R. and Nakamura, K. 2009. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 513-557.
- Mehvar, R. and Brocks, D.R. 2004. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics: Cardiovascular drugs, In: *Chirality in Drug Design and*

- Development. Reddy, I.K. and Mehvar, R. (eds), Marcel Dekker, 281-350, New York.
- Montgomery, D.C. 2001. Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons, USA.
- Montgomery, D.C. and Runger, G.C. 2007. Applied Statistics and Probability for Engineers. John Wiley & Sons, 602-610, UK.
- Mullard, A. 2016. 2015 FDA drug approvals. Nature Reviews, Drug Discovery, News and Analysis, 15, 73-76.
- Murthy, M.S.R.C., Swaminathan, T., Rakshit, S.K. and Kosugi, Y. 2000. Statistical optimization of lipase catalyzed hydrolysis of methyl oleate by response surface methodology. Bioprocess Engineering, 22(1), 35-39.
- Nasário, F.D., Cazetta, T., Moran, P.J.S. and Rodrigues, J.A.R. 2016. Deracemization of 1-phenylethanol via tandem biocatalytic oxidation and reduction. Tetrahedron: Asymmetry, 27, 404-409.
- Ni, Y. and Xu, J. 2012. Biocatalytic ketone reduction: A green and efficient access to enantiopure alcohols. Biotechnology Advances, 30, 1279-1288.
- Niladevi, K.N., Sukumaran, R.K., Nicemol Jacob, N., Anisha, G.S. and Prema, P. 2009. Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. Microbiological Research, 164(1), 105-113.
- Nishide, K., Ohsug, S., Fudesaka, M., Kodama, S. and Node, M. 2002. New odorless protocols for the Swern and Corey-Kim oxidations. Tetrahedron Letters, 43, 5177-5179.
- Palmeira, D.J., Araújo, L.S., Abreu, J.C. and Andrade, L.H. 2014. Application of a promiscuous *Arthrobacter* sp. from Antarctic in aerobic (R)-selective deracemization and anaerobic (S)-selective reduction. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 110, 117-125.
- Patil, M.D., Shinde, K.D., Patel, G., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. 2016. Use of response surface method for maximizing the production of arginine deiminase by *Pseudomonas putida*. Biotechnology Reports, 10, 29-37.
- Petschacher, B., Staunig, N., Müller, M., Schürmann, M., Mink, D., De Wildeman, S., Gruber, K. and Glieder, A. 2014. Cofactor specificity engineering of *Streptococcus mutans* NADH oxidase 2 for NAD(P)(+) regeneration in biocatalytic oxidations. Computational and Structural Biotechnology Journal, 9(14), 272-282.

- Plackett, R.L. and Burman, J.P. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Oxford Journals*, 33(4), 305-325.
- Quinlan, K.R. and Lin, K.J. 2015. Run order considerations for Plackett and Burman designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 165, 56-62.
- Rai, A., Mohanty, B. and Bhargava, R. 2016. Supercritical extraction of sunflower oil: A central composite design for extraction variables. *Food Chemistry*, 192, 647-659.
- Rajagopalan, A. and Kroutil, W. 2011. Biocatalytic reactions: selected highlights. *Materials Today*, 14(4), 144-152.
- Rampal, P., Saini, H.S., Raj, M., Chimni, S.S. and Chadha, B.S. 2007. Enantiocomplementary reduction of 3-phenylthioprop-2-one by *Bacillus* sp.: Effect of medium components. *Bioresource Technology*, 98, 725-728.
- Rehn, G., Pedersen, A.T. and Woodley, J.M. 2016. Application of NAD(P)H oxidase for cofactor regeneration in dehydrogenase catalyzed oxidations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 331-339.
- Ribeiro, A.R., Maia, A.S., Cass, Q.B. and Tritan, M.E. 2014. Enantioseparation of chiral pharmaceuticals in biomedical and environmental analyses by liquid chromatography: An overview. *Journal of Chromatography B*, 968, 8-21.
- Ribeiro, C., Santos, C., Gonçalves, V., Ramos, A., Afonso, C. and Tritan, M.E. 2018. Chiral drug analysis in forensic chemistry: An overview. *Molecules*, 23(262), 1-47.
- Ricca, E., Brucher, B. and Schrittwieser, H.J. 2011. Multi-enzymatic cascade reactions: Overview and Perspectives. *Adv. Synth. Catal.*, 353, 2239-2262.
- Sağol, E. 2015. İstatistiksel deney tasarımının Çayırhan bölgesi linyitlerinin flotasyonunda uygulanması. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Santoro, M.M., Cho, H.S. and Kedor-Hackmann, E.R.M. 2001. Enantiometric separation and quantitative determination of propranolol in tablets by chiral high-performance liquid chromatography. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(7), 693-697.
- Satyawali, Y., Vanbroekhoven, K. and Dejonghe, W. 2017. Process intensification: The future for enzymatic processes? *Biochemical Engineering Journal*, 121, 196-223.
- Schober, M. and Faber, K. 2013. Inverting hydrolases and their use in enantioconvergent biotransformations. *Trends in Biotechnology*, 31(8), 468-478.

- Schrittwieser, J.H., Sattler, J., Resch, V., Mutti, F.G. and Kroutil, W. 2011. Recent biocatalytic oxidation-reduction cascades. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 249-256.
- Seddigi, Z.S., Malik, S., Ahmed, S.A., Babalghith, A.O. and Kamal, A. 2017. Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase-metal combinations for dynamic processes. *Coordination Chemistry Reviews*, 348, 54-70.
- Silva, C.R., Souza, J.C., Araújo, L.S., Kagohara, E., Garcia, T.P., Pelizzari, V.H. and Andrade, L.H. 2012. Exploiting the enzymatic machinery of *Arthrobacter atrocyaneus* for oxidative kinetic resolution of secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 83, 23-28.
- Simon, R.C., Mutti, F.G. and Kroutil, W. 2013. Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*, 10(1), 37-44.
- Solano, D.M., Hoyos, P., Hernáiz, M.J., Alcántara, A.R. and Sánchez-Montero, J.M. 2012. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, 115, 196-207.
- Stoschitzky, K., Lindner, W. and Zernig, G. 1998. Racemic beta-blockers- fixed combinations of different drugs. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*, 1(1), 15-19.
- Strauss, U.T., Felfer, U. and Faber, K. 1999. Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100 % chemical yield and 100 % enantiomeric excess. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 107-117.
- Sudar, M., Findrik, Z., Domanovac, M.V. and Vasić-Rački, D. 2014. Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactococcus lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 12-18.
- Sugai, T., Higashibayashi, S. and Hanaya, K. 2018. Recent examples of the use of biocatalysts with high accessibility and availability in natural product synthesis. *Tetrahedron*, 74(27), 3469-3487.
- Sun, Y., Han, B., Liu, W., Zhang, J. and Gao, X. 2007. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. *Bioresource Technology*, 98(8), 1548-1553.
- Şenoğlu, B. ve Acıtaş, Ş. 2010. İstatistiksel Deney Tasarımı: Sabit Etkili Modeller. Nobel Yayınevi, 4 s., Ankara.
- Temino, D.M.-R.D., Hartmeier, W. and Ansorge-Schumacher, M.B. 2005. Entrapment of the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* in polyvinyl

- alcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 3-9.
- Voss, C.V., Gruber, C.C. and Kroutil, W. 2007. A biocatalytic one pot oxidation/reduction sequence for deracemisation of a sec-alcohol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 276-281.
- Voss, C.V., Gruber, C.C. and Kroutil, W. 2008a. Deracemization of secondary alcohols through a concurrent tandem biocatalytic oxidation and reduction. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 741-745.
- Voss, C.V., Gruber, C.C., Faber, K., Knaus, T., Macheroux, P. and Kroutil, W. 2008b. Orchestration of concurrent oxidation and reduction cycles for stereoinversion and deracemisation of sec-alcohols. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 13969-13972.
- Wohlgemuth, R. 2010. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 283-292.
- Yang, M.Y., Zhang, J.W., Wu, X.R. and Chen, Y.J. 2017. Optimization of critical medium components for enhancing antibacterial thiopeptide nocathiacin I production with significantly improved quality. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(4), 292-300.
- Yan, Z., Nie, Y., Xu, Y., Liu, X. and Xiao, R. 2011. Biocatalytic reduction of prochiral aromatic ketones to optically pure alcohols by a coupled enzyme system for cofactor regeneration. *Tetrahedron Letters*, 52, 999-1002.
- Yerlikaya, F. 2013. Paklitaksel nanopartiküllerinin kalite tasarımı ile geliştirilmesi ve değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı, Ankara.
- Zanon, J.P., Peres, M.F.S. and Gattas E.A.L. 2007. Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 466-470.
- Zelaszczyk, D. and Kononowicz, K.K. 2007. Biocatalytic approaches to optically active β -blockers. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 53-65.

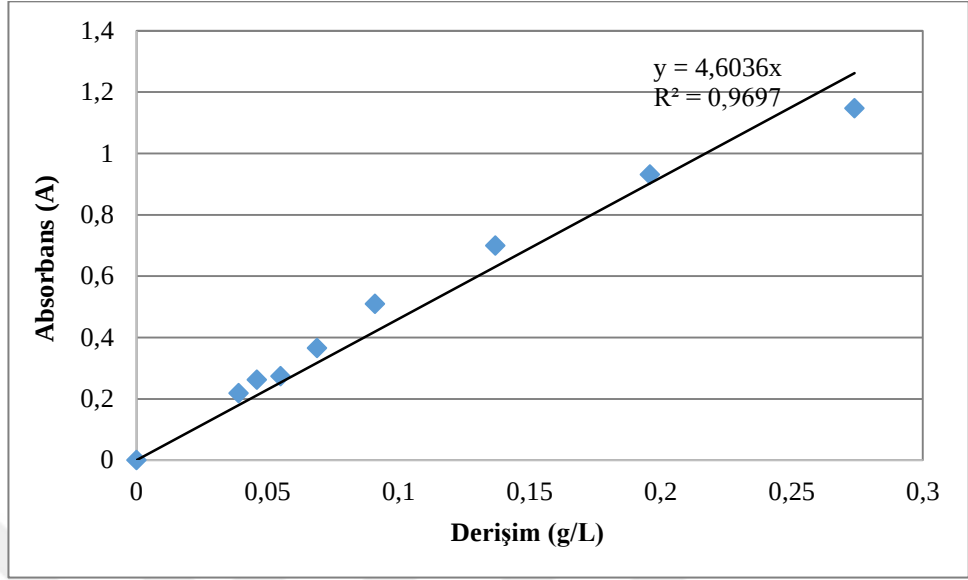
EKLER

EK 1 *Pichia mexicana* Kuru Hücre Derişimine Göre Kalibrasyon Grafiğı

EK 2 ADH ve NADH Oksidaz Enzim Aktivitesi Hesaplama Yöntemi

EK 3 Örnek Kromatogram

EK 1 *Pichia mexicana* Kuru Hücre Derişimine Göre Kalibrasyon Grafiğı



Şekil 1 *Pichia mexicana* kuru hücre derişimine göre kalibrasyon grafiğı ($\lambda=400$ nm)

EK 2 ADH ve NADH Oksidaz Enzim Aktivitesi Hesaplama Yöntemi

Zamanla absorbans değişimi ($\lambda=340$ nm) $\rightarrow$ Eğim= $\Delta A/\Delta t$

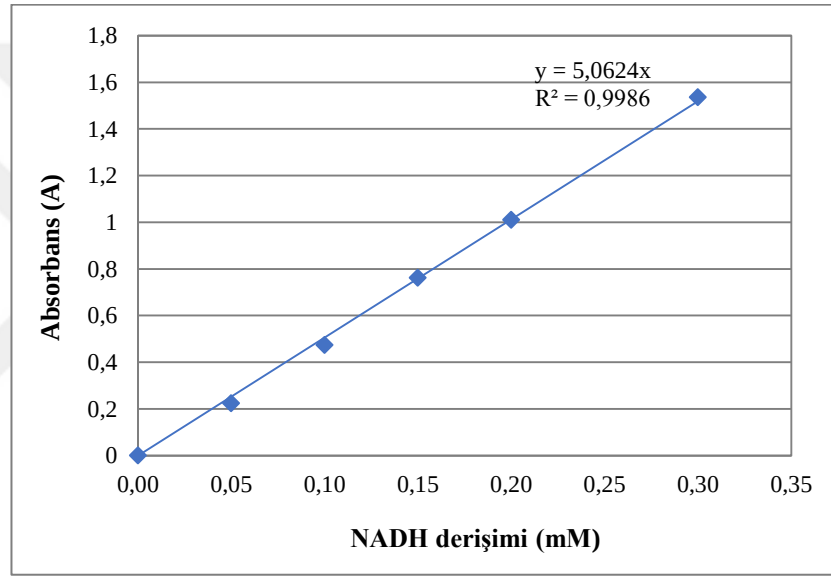
β -NADH kalibrasyon grafiği $\rightarrow \Delta C/\Delta t$ ($\Delta C_{\text{NADH}} = \Delta C_{\text{etanol}}$)

$\Delta C/\Delta t \times V$ (mL)= μmol substrat/dk (U)

U/v (mL)=U/mL

V: Toplam hacim, mL

v: Örnek hacmi, mL



Şekil 1 β -NADH kalibrasyon grafiği ($\lambda=340$ nm)

Örnek Hesaplama (L. kefir’de ADH aktivitesi):

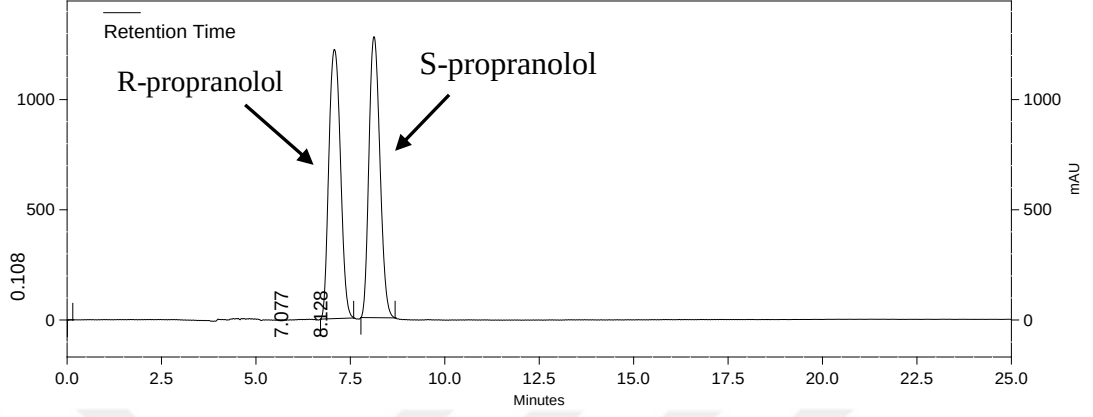
$\Delta A/\Delta t$ (340 nm) = 0.0125 A/dk

β -NADH kalibrasyon grafiği $\rightarrow \Delta C/\Delta t = 2.47 \times 10^{-3}$ mM/dk

($\Delta C_{\text{NADH}} = \Delta C_{\text{etanol}} = 2.47 \mu\text{M/dk}$)

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} \times \frac{V}{v} = 2.47 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L. dk}} \times \frac{3 \text{ mL}}{200 \times 10^{-3} \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} = 0.037 \text{ U/mL}$$

EK 3 Örnek Kromatogram



Şekil 1 Saf rasemik propranololün HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogram (R-propranololün kalma süresi: 7 dk, S-propranololün kalma süresi. 8 dk)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Rahime SONGÜR
Doğum Yeri : Altındağ /ANKARA
Doğum Tarihi : 18.06.1984
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Çankaya Süper Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı Lise) (2002)
Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği
Bölümü (2006)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği
Anabilim Dalı (2009)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü - Araştırma
Görevlisi (2007-halen)

Yayınlar (SCI)

Songür, R., Lurçi, B., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü., Demir, A.S. 2011. Enantioselective production of benzoin from benzoin acetate via kinetic resolution and deracemization using *Rhizopus oryzae*. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 39: 162–168.

Songür, R., Mehmetoğlu, Ü. 2018. The effects of ultrasonication and reaction parameters on the biocatalytic deracemization of racemic propranolol. Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 33 (2), 575-583.

Hakemli Dergiler

Songür, R., Mehmetoğlu, Ü. (2017) Rasemik propranololün biyokatalitik yükseltgenme tepkimesi için uygun mikroorganizma seçimi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi: PART:C “Tasarım ve Teknoloji” Dergisi, 5 (1): 13-25.

Uluslararası Kongre Sunum

Songür, R., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. Effects of ultrasonication and lyophilization on the enantiomerically pure benzoin production, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends (BIOTECH), 27-30 September 2009, METU, Ankara, Turkey.

Songür, R., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. Investigating the deracemization mechanism for enantiomerically pure benzoin production from racemic benzoin acetate with *Rhizopus oryzae*, 19th International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2010) and the 7th European Congress of Chemical Engineering (ECCE-7), 28 August-1 September 2010, Prague, Czech Republic.

Songür, R., Babaarslan, Ç., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. Biocatalytic racemization of racemic benzoin using *Rhizopus oryzae*, 6th Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean Countries (EMCC-6), 7-12 March 2010, Antalya, Turkey.

Songür, R., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. Removal of a reactive dye by adsorption utilizing waste aluminium hydroxide sludge as an adsorbent, International Conference on Chemical Engineering (ICCE 2011), 28-30 November 2011, Venice, Italy.

Songür, R., Atıcı, E.M., Mehmetoğlu, Ü. Deracemization of 1-phenyl ethanol via tandem biocatalytic oxidation and reduction, European Biotechnology Congress (EURO BIOTECH), 28 September-1 October 2011, Istanbul, Turkey.

Songür, R., Mehmetoğlu, Ü. The effect of different parameters to the biocatalytic deracemization of racemic propranolol, 1st International Conference on Green Chemistry and Sustainable Technologies (GCSTI 2015), 30 September-3 October 2015, Izmir, Turkey.

Uzun, E., **Songür, R.**, Bayraktar, E. Design of medium conditions by Plackett Burman Method for microbial production of cis,cis-muconic acid, International Congress on Chemistry and Materials Science (ANCON 2017), 5-7 October 2017, Ankara, Turkey.

Songür, R., Mehmetoğlu Ü. The effect of *Rhizopus oryzae* growth parameters to the biocatalytic deracemization of racemic propranolol, 22nd International Biomedical Science & Technology Symposium (BIOMED 2017), 12-14 May 2017, Ankara, Turkey.

Songür, R., Mehmetoğlu Ü. The Effect of Some Reaction Parameters on The Deracemization of Racemic Propranolol by *Rhizopus oryzae*, 9th Eastern Mediterranean Chemical Engineering Conference (EMCC9), 31 August–2 September 2018, Ankara, Turkey.

Songür, R., Mehmetoğlu Ü. The Effects of Some Reaction Parameters on The Biocatalytic Deracemization of Racemic Propranolol, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), 26-27 April 2018, Ankara, Turkey.

Bozan, A., **Songür, R.**, Mehmetoğlu Ü. The Production of Enantiomerically Pure 1-Phenylethanol via Enzymatic Kinetic Resolution Method, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), 26-27 April 2018, Ankara, Turkey.

Ulusal Kongre Sunum

Songür, R., Karadeniz, F., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. (R,S)-1-fenil 1-propanolün Lipozyme RM IM[®] enzimi ile kinetik rezolüsyonuna bazı işletim parametrelerinin etkisi, 7. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-7), 5-8 Eylül 2006, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

Sağlam, D.N., **Songür, R.**, Bayraktar, E. Enantiyomerik saflıkta mikrobiyal olarak benzoin üretimine mikroorganizma üretim pH'ının etkisi, 8. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-8), 26-29 Ağustos 2008, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Songür, R., Lurçi, B., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. Rasemik benzoin asetatın *Rhizopus oryzae* biyokatalizörlüğünde hidrolizi ile enantiyomerik saflıkta benzoin üretimi, 8. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-8), 26-29 Ağustos 2008, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Songür, R., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, Ü. *Rhizopus oryzae* biyokatalizörlüğünde enantiyomerik saflıkta benzoin üretimine mikroorganizma ve substrat derişiminin etkisi, 9. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-9), 22-25 Haziran 2010, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Ak, P., **Songür, R.**, Mehmetoğlu, Ü. Biyokatalitik derasemizasyon prosesi ile enantiyomerik saflıkta 1-feniletanol üretimi, 1. İlaç Kimyası Kongresi, 29-31 Mart 2013, Antalya.

Altuntaş, M., **Songür, R.**, Mehmetoğlu, Ü. Mikrobiyal indirgenme tepkimeleri ile haloketonlardan enantiyomerik saflıkta adrenerjik beta bloker üretimi, 2. Ulusal Kimya Mühendisliği Öğrenci Kongresi, 4-6 Mayıs 2013, Ankara.

Acay, C., **Songür, R.**, Mehmetoğlu, Ü. Biyotransformasyon ile enantiyomerik saflıkta propranolol üretimi, 2. Ulusal Kimya Mühendisliği Öğrenci Kongresi, 4-6 Mayıs 2013, Ankara.

Songür, R., Mehmetoğlu, Ü. Rasemik propranololün biyokatalitik yükseltgenme tepkimesi için uygun mikroorganizma seçimi, 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 2-5 Eylül 2014, Eskişehir.

Projeler

“S-Propranolol Üretiminde Kullanılan Halohidrinin Maya Biyokatalizörlüğünde Enantiyoseçimli Üretimi”, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (11Ö4343003), Yardımcı Araştırmacı, 06.07.2011-06.07.2013.

“Derasemizasyonla Enantiyomerik Saflıkta 1-Feniletanol Üretimi”, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (12Ö4343004), Yardımcı Araştırmacı, 02.01.2012-02.01.2014.

“Asetofenonun Bitki Biyokatalizörlüğünde İndirgenmesi ile Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil Etanol Üretimi”, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (12B4343010), Yardımcı Araştırmacı, 02.01.2012-02.01.2015.

“Biyokatalitik Olarak Enantiyomerik Saflıkta β -Blokör Üretimi”, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (14L0443004), Yardımcı Araştırmacı, 13.05.2014-13.11.2016.